

STOFFWECHSELLEISTUNGEN VARIANTER STÄMME PFLANZLICHER ZELLKULTUREN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Brigitte Deus
aus Essen

Bochum 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

STOFFWECHSELLEISTUNGEN VARIANTER STÄMME PFLANZLICHER ZELLKULTUREN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Brigitte Deus
aus Essen

Bochum 1980



1. Referent: Prof. Dr. M.H. Zenk
2. Referent: Prof. Dr. R. Berzborn
eingereicht am: 24. 10. 1980
Tag der mündl. Prüfung: 19. 12. 1980

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	18
1. Pflanzenmaterial und Zellkultur- techniken	18
1.1 Herkunft der verwendeten Zell- kulturen und Pflanzen	18
1.2 Medien	19
1.3 Sterilisationsverfahren	20
1.4 Animpfen von Schüttelkolben	20
1.5 Plattierungstechnik	20
1.6 Kulturbedingungen	21
2. Messung verschiedener Wachstumsparameter	22
2.1 Frisch- und Trockengewichts- bestimmung	22
2.2 Charakterisierung der Parameter im Medium	22
3. Quantitative Bestimmung der Inhalts- stoffe	23
3.1 Extraktionsverfahren	23
3.2 Chromatographische Analysen und quantitative Auswertung	23
3.3 Radioimmunoassay	25
3.4 Photometrie	25
4. Alkaloidisolierung und Identifizierung ...	26
4.1 Gewebeaufarbeitung	26
4.2 Chromatographische Analyse	27
4.3 Spektroskopie	27
5. Mikroskopie	28
5.1 Bestimmung von Zellzahl und Zellgröße	28
5.2 Fluoreszenzmikroskopie	28
5.3 Filmmaterial	29
5.4 Färbeverfahren	29
6. Selektionsverfahren	30
7. Enzymtests	31
7.1 Aufschluß des Gewebes	31
7.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten	32

	Seite
7.2.1 Zellfreie Synthese von Indolalkaloiden	32
7.2.2 Strictosidin-Synthase	32
7.2.3 Spezifische Glucosidase	34
7.2.4 Unspezifische Glucosidase	34
7.2.5 Saure Phosphatase	35
7.3 Proteinbestimmung	36
8. Applizierte Substanzen	36
9. Radiochemikalien	37
10. Radioaktivitätsmessung	38
11. Immobilisierung von Pflanzenzellen	38
11.1 Einschlußmethode	38
11.2 Kultivierung immobilisierter Zellen	39
11.3 Kontinuierliche Alkaloidbildung im Säulenverfahren	39
12. Protoplastenisolierung	40
12.1 Enzymlösungen und Reinigungsmethode ..	41
12.2 Inkubationsmedium und Inkubations- bedingungen	42
13. Vakuolenisolierung	43
13.1 Aufschluß- und Reinigungsverfahren ...	43
13.2 Inkubationsmedium und Inkubations- bedingungen	45
13.3 Filtrationszentrifugation	45
III. ERGEBNISSE	47
1. Variationen des Alkaloidgehaltes inner- halb einer Zellpopulation	47
1.1 Untersuchungen an Zellkolonien	49
1.2 Alkaloidbildung varianter Zellstämme gleicher Abstammung	53
2. Selektion varianter Zellstämme mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie	57
2.1 Vergleich der Alkaloidgehalte mit dem fluoreszenzmikroskopischen Erscheinungsbild	60
2.2 Vergleich der Alkaloidgehalte se- lektierter und nicht selektierter Kolonien einer Zellpopulation von <i>Catharanthus roseus</i>	63
2.3 Selektierte Zellstämme mit erhöhter Alkaloidproduktion	68
2.4 Variante Zellstämme von <i>Ruta chalepensis</i>	70

	Seite
2.4.1 Makroskopische und mikroskopische Charakterisierung	71
2.4.2 Variationen im Muster der Inhaltsstoffe	72
2.5 Zellstämme verschiedener Eschscholtzia-Arten	73
2.5.1 Selektion von Zellkolonien	73
2.5.2 Charakterisierung der angelegten Zellstämme	75
3. Kinetische Untersuchungen an Zellsuspensionskulturen von <i>Catharanthus roseus</i> ..	80
3.1 Charakterisierung verschiedener Stämme in Bezug auf Wachstum und zeitliche Abhängigkeit der Alkaloidbildung	82
3.2 Wachstum, Produktbildung, Enzymaktivitäten und Mediumzusammensetzung während der Kultivierung eines ausgewählten Stammes von <i>Catharanthus roseus</i>	95
3.2.1 Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung ...	101
3.2.2 Charakterisierung des Kulturmediums	103
3.2.3 Kinetische Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten im Zellmaterial	105
4. Einflüsse applizierter Substanzen auf die Stoffwechselleistungen von <i>Catharanthus</i> Zellkulturen	110
4.1 Variationen im Alkaloidgehalt von <i>Catharanthus roseus</i> Kulturen nach Zugabe verschieden substituierter Phenoxyessigsäuren	113
4.2 Applikation von Alkaloidvorstufen	121
5. Einfluß von Aminosäure-Analoga auf Wachstum und Sekundärstoffakkumulation	134
5.1 Applikation von 5-Methyltryptophan an Kulturen von <i>Catharanthus roseus</i> ...	136
5.1.1 Wachstum und Alkaloidbildung in Abhängigkeit von der 5-Methyltryptophan-Konzentration	138
5.1.2 Alkaloidbildung von 5-Methyltryptophan-behandelten und unbehandelten Zellkolonien	139
5.1.3 Selektion von Zellkolonien nach 5-Methyltryptophan-Behandlung	144
5.1.4 Zellstämme mit erhöhter Alkaloidproduktion	148

	Seite
6. Chromosomenuntersuchungen an varianten Zellstämmen von <i>Catharanthus roseus</i>	153
7. Stoffwechselleistungen immobilisierter Pflanzenzellen	164
7.1 Indolalkaloidbildung aus applizierten Vorstufen	168
7.2 De novo-Synthese von Anthrachinonen....	172
7.3 Biotransformation	175
8. Untersuchungen an isolierten Proto- plasten und Vakuolen	179
8.1 Lokalisierung von Enzymen und End- produkten der Indolalkaloidbiosynthese	181
8.2 Alkaloidbildung isolierter Proto- plasten nach Applikation von Vorstufen	194
8.3 Aufnahme applizierter Alkaloide durch isolierte Protoplasten und Vakuolen	195
8.3.1 Untersuchungen zur selektiven Aufnahme spezifischer Alkaloide	202
8.3.2 Parameter der Akkumulation applizierter Alkaloide durch isolierte Vakuolen	207
IV. DISKUSSION	217
V. ZUSAMMENFASSUNG	249
VI. LITERATUR	254

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DNS (DNA)	Desoxyribonucleinsäure
dpm	Zerfallsrate (desintegrations per minute)
h	Stunde
IR	Infrarot
kat	Katal (Einheit der katalytischen Aktivität eines Enzyms; 1 kat entspricht der Menge Enzym, die in der Lage ist, 1 Mol Substrat pro Sekunde umzusetzen)
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
NAA	1-Naphthylessigsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
OSB	ortho-Succinylbenzoesäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett

I. EINLEITUNG

"Wir haben gesehen, daß alle Organismen aus wesentlich gleichen Teilen, nämlich aus Zellen zusammengesetzt sind, ... Finden wir nun, daß einzelne dieser Elementarteile, ..., sich vom Organismus lostrennen und selbständig weiter wachsen können, so können wir daraus schließen, daß auch jeder der übrigen Elementarteile, ..., ein selbständiges Leben besitzt, vermöge dessen er selbständig sich zu entwickeln imstande wäre, wenn ihm bloß die äußeren Bedingungen dargeboten würden, unter welchen er im Organismus steht" (SCHWANN, 1839).

Diese von SCHWANN bereits in der Mitte des vorigen Jahrhunderts formulierte Zellentheorie, die die Universalität der Zellstruktur und die autonome physiologische Einheit der Zelle postulierte, war der grundlegende Gedanke für die Kultivierung tierischer und pflanzlicher Zellen. Aufbauend auf dieser Theorie versuchte HABERLANDT bereits 1902 künstlich isolierte Einzelzellen höherer Pflanzen in Nährlösung zu kultivieren, um die Zelle als kleinsten, selbständig lebensfähigen Elementarorganismus herausgelöst aus ihrem natürlichen Gewebeverband untersuchen zu können. Er hoffte dabei, Erkenntnisse über die Eigenschaften und Fähigkeiten einer Zelle als autonome Einheit und über die Wechselbeziehungen und gegenseitige Beeinflussung der Zellen im Gesamtorganismus zu erhalten.

HABERLANDT gelang es, die verwendeten Einzelzellen in der Nährlösung über einen kurzen Zeitraum am Leben zu erhalten; er konnte auch Streckungswachstum der Zellen beobachten aber nie Teilungen feststellen. Ursache für das Ausbleiben der Zellteilungen war das Fehlen von Pflanzenhormonen in der Nährlösung. Erst durch Zugabe von Hormonen, besonders wichtig sind Auxine als Zellstreckungs-

hormone und Kinetine als Zellteilungshormone, können Zellteilung und Wachstum in einer Zellkultur induziert werden.

Durch Verwendung von meristematischem Gewebe, also noch teilungsfähigen Zellzonen, die zur selbständigen Bildung dieser Hormone fähig sind, gelang es NOBÉCOURT (1937, 1938) und GAUTHERET (1939), Kallusgewebebildung an Wurzelspitzen von Daucus carota auszulösen und so Kallusstämme zu etablieren, die sich durch unbegrenzte Teilungsaktivität auszeichneten.

Kallusgewebe, ein Aggregat aus sich ungeordnet teilenden Zellen, wächst als Oberflächenkultur auf einem durch Zugabe von Agar verfestigtem Nährmedium, das sich aus Mineralsalzen, Spurenelementen, einer Kohlenstoffquelle, Vitaminen und Hormonen zusammensetzt. Durch Übertragen von Kallusstücken in flüssiges Nährmedium wurden von MUIR, HILDEBRANDT und RIKER (1954) die ersten Submerskulturen angelegt. Aus Kallus von Nicotiana und Tagetes erhielten sie Suspensionskulturen, in denen sich Einzelzellen und kleine Zellaggregate durch fortwährende Zellteilungen vermehrten und auch nach wiederholter Subkultur ihre Teilungsfähigkeit beibehielten.

In den darauffolgenden Jahren hat die Zahl der Pflanzen, von denen Kallus- und Suspensionskulturen angelegt werden konnten, ständig zugenommen. Durch Wahl eines geeigneten Nährmediums mit optimaler Hormonzusammensetzung ist es heute möglich, von nahezu jeder Pflanzenart Zellkulturen anzulegen.

Daß diese in einer künstlichen Nährlösung gehaltenen Zellen totipotent und zu autonomen physiologischen Leistungen fähig sind, konnten erstmals STEWARD, MAPES und MEARS 1958 beweisen, als es ihnen gelang, aus Einzelzellen von Daucus carota intakte Pflanzen zu regenerieren.

Eine einzelne in Kultur gehaltene Zelle besitzt also das gesamte genetische Potential der differenzierten Pflanze und sollte zu den gleichen morphologischen, physiologischen und biochemischen Leistungen befähigt sein wie die intakte differenzierte Pflanze. Die Totipotenz wurde in der Folge durch Regeneration kultivierter Zellen zu differenzierten Pflanzen mehrfach nachgewiesen, so z.B. an Nicotiana tabacum (TAKEBE et al., 1971), Petunia hybrida (BINDING, 1974), Catharanthus roseus (DHRUVA et al., 1977; ABOU-MANDOUR et al., 1978) und an Solanum-Arten (GRUN und CHU, 1978).

Pflanzliche Zellkulturen bieten für die experimentelle Forschung wesentliche Vorteile, vergleicht man sie mit Pflanzenmaterial, das durch Anbau gewonnen wurde. Zellkulturen können unabhängig von der Jahreszeit unter konstanten und kontrollierbaren Bedingungen gehalten werden, so daß Material von einheitlichem Entwicklungszustand zur Verfügung steht. Es können jederzeit größere Mengen Zellmaterial bereitgestellt werden, ohne eine große Anbaufläche zu beanspruchen. Pflanzenzellen, die im Medium als homogene Suspension wachsen, können ähnlich behandelt werden wie Bakterien- oder Hefekulturen, und so war es möglich, allgemein übliche Methoden zur Mikrobiologie auf die Erforschung pflanzlicher Zellen zu übertragen. Durch Anwendung der Plattierungstechnik konnte BERGMANN erstmals (1960) isolierte Einzelzellen zur Teilung und zur Bildung von Zellklonen anregen und damit eine wichtige Grundlage für Mutations- und Selektionsexperimente an pflanzlichen Zellkulturen geben. Durch Ausarbeitung einer speziellen Replikatechnik am Beispiel von Morinda citrifolia Zellsuspensionskulturen wurde eine in der Mikrobiologie zum Auffinden von Stoffwechselmutanten gebräuchliche Methode erfolgreich auch für pflanzliche Zellen angewendet (SCHULTE, 1978).

Pflanzliche Zellkulturen sind nicht nur im Hinblick auf zytologische, morphologische oder genetische Probleme interessant. Sie wurden in den letzten Jahren auch verstärkt zur Untersuchung physiologischer Aspekte eingesetzt. Die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen ist gegenüber der der Zellen differenzierter Pflanzen stark erhöht, und so lag es nahe, die physiologische Potenz der Pflanzenzellen zur Erforschung von Biosynthesewegen und zur Produktion von Inhaltsstoffen heranzuziehen.

In intakten Pflanzen sind die Konzentrationen und die Aktivitäten der Enzyme des Sekundärstoffwechsels oft recht gering, Enzymisolierungen und Charakterisierung von Stoffwechselwegen sind daher erschwert und oft unmöglich. Erst durch Verwendung von Zellkulturen von Petroselinum hortense und Glycine max als Material zur Enzymgewinnung war z.B. der entscheidende Durchbruch für die Aufklärung der Biosynthese der Flavanoïdglykoside gemacht worden (HAHLBROCK et al., 1971 a, 1971 b).

Mit Hilfe von zellfreien Präparationen aus Suspensionskulturen von Nicotiana glauca konnte der wesentliche Schritt der Chlorogensäure-Synthese aufgeklärt werden; so wurde nachgewiesen, daß bei ihrer Bildung Chinasäure auf Caffeoyl-CoA übertragen wird und durch Kondensation mit dem Caffeoyl-Anteil unter Abspaltung von Coenzym-A Chlorogensäure entsteht (STÖCKIGT und ZENK, 1974).

Eine weitere Schlüsselreaktion, die zu dem vielfältigen Spektrum von Benzylisochinolin-Derivaten führt, ist die Umwandlung von Reticulin in Scoulerin. Sie beruht auf dem Einbau der N-Methylgruppe des Reticulins in die Berberin-Brücke des Scoulerins. Das für diesen wichtigen Reaktionsschritt verantwortliche Enzym, das sogenannte Berberin-Brücken-Enzym, konnte aus Suspensionskulturen der Papa-

veraceae Macleaya microcarpa isoliert und seine Eigenschaften charakterisiert werden (BÖHM und RINK, 1975; RINK und BÖHM, 1975).

Mit Hilfe von Zellmaterial aus Catharanthus roseus Suspensionskulturen konnten die wichtigsten Syntheseschritte für die Bildung der Indolalkaloide vom Corynanthe-Typ im zellfreien System aufgeklärt werden. So wurde eindeutig bewiesen, daß die Vorstufe für monoterpenoide Catharanthus-Alkaloide, die durch enzymatische Kondensation von Tryptamin und Secologanin gebildet wird, das 3- α (S)-Strictosidin und nicht das bisher angenommene 3- β (R)-Epimer Vincosid ist (STÖCKIGT und ZENK, 1977).

Untersuchungen über die Biosynthese von Pflanzeninhaltsstoffen geben Einblicke in die Regulationsprinzipien, die der Bildung dieser Substanzen zu Grunde liegen. Darüber hinaus bietet sich die Möglichkeit, experimentell in diese Synthesewege einzugreifen, um in Kultur gehaltene Zellen gezielt zur Produktion eines gewünschten Inhaltsstoffes zu veranlassen.

Die Gewinnung von Pflanzeninhaltsstoffen aus Zellkulturen wäre besonders für medizinisch-therapeutisch wichtige Substanzen erstrebenswert. Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der chemischen und pharmazeutischen Technologie sind Pflanzen immer noch die einzige Quelle für viele arzneilich verwendete Grundstoffe. Steigender Bedarf an Drogenmaterial und gleichzeitige Verknappung der Medizinalpflanzen durch unüberlegtes Ausbeuten des Pflanzenbestandes und technische Probleme bei der Feldkultivierung haben zu Versorgungsschwierigkeiten geführt. Könnte das biochemische Potential der in Kultur gehaltenen Zellen zur Produktion von Arzneistoffen, eventuell sogar im biotechnologischen Maßstab, genutzt werden, würde das nicht nur zum Umgehen der Versorgungs-

schwierigkeiten beitragen. Mit Hilfe von Zellkulturen könnte Rohmaterial zur Verfügung gestellt werden, das sich vor allem durch gleichbleibende Qualität auszeichnet. Wild wachsende oder in Feldkultur gehaltene Pflanzen sind dagegen ständig äußeren Einflüssen durch Klima, Insektenbefall oder Pflanzenkrankheiten ausgesetzt, Faktoren also, die die Bildung von Inhaltsstoffen negativ beeinflussen können. Durch Anlage von Zellkulturen könnten Pflanzen extremer Standorte an jedem beliebigen Ort kultiviert werden, die Produktion wichtiger Inhaltsstoffe wäre damit nicht nur unabhängig vom Klima sondern auch von politisch-wirtschaftlichen Unsicherheiten. Zudem könnte die Produktion von arzneilich genützten Rohstoffen durch schnell wachsende Zellkulturen sehr viel leichter der weltwirtschaftlichen Marktlage angepaßt werden. Voraussetzung für eine biotechnologische Nutzung von kultivierten Pflanzenzellen zur Produktion von Inhaltsstoffen sind Zellstämme, deren Stoffwechselleistungen denen der differenzierten Pflanze entsprechen, sie eindeutig übertreffen, oder durch gezielte Selektion zur erhöhten Bildung von Nebenalkaloiden fähig sind, die in der Pflanze selbst nur in Spuren vorhanden sind.

Viele Inhaltsstoffe differenzierter Pflanzen konnten bereits in Kallus- oder Suspensionskulturen nachgewiesen werden. Meistens war aber der Gehalt sehr gering oder die interessierenden Substanzen waren gar nicht oder nur in Spuren vorhanden. Über die Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen hatte TEUSCHER zu Beginn der siebziger Jahre berichtet und konnte damals nur eine Pflanze angeben (Ammi visnaga), deren Zellen als Suspensionskultur einen höheren Naturstoffgehalt (Visnagin) als die der differenzierten Pflanze aufwiesen (TEUSCHER, 1973).

In den vergangenen Jahren wurde aber in vielen Fällen gezeigt, daß es durch Optimierung der Medien, durch veränderte Kulturbedingungen (Licht, Temperatur) oder durch Anwendung spezieller Techniken (Selektion, mutagene Behandlung) gelingt, die Stoffwechselleistungen der Zellkulturen soweit zu erhöhen, daß sie denen der Pflanze weit überlegen sind. Kalluskulturen von Cassia tora wiesen einen 10fach höheren Gehalt an den Anthrachinonen Chrysophanol, Emodin und Physcion auf, vergleicht man ihn mit dem der Samen der Ausgangspflanze. Diese Steigerung konnte durch ein ausgewogenes Verhältnis der Hormone, in diesem Fall Kinetin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure erreicht werden (TABATA et al., 1975).

Die Produktion von Anthrachinonen in Suspensionskulturen von Morinda citrifolia wurde dagegen durch Zugabe von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure fast vollständig unterdrückt. Eine erhebliche Steigerung der Sekundärstoffbildung wurde durch Naphtylessigsäure im Medium und gleichzeitiger Zugabe der Anthrachinonvorstufe o-Succinylbenzoesäure (OSB) erreicht, so daß die Gewebekultur den Anthrachinongehalt des differenzierten Wurzelgewebes etwa um das 8fache übertraf (ZENK et al., 1975).

Der höchste bisher erzielte Gehalt eines einzelnen Inhaltsstoffes wurde durch Suspensionskulturen von Coleus blumei produziert. In einem Medium ohne Zusatz von Hormonen wurde nach Erhöhen der Saccharaosekonzentration ein drastischer Anstieg der Rosmarinsäurebildung gemessen. Unter optimalen Bedingungen wurden 13 - 15 % Rosmarinsäure in den Zellen akkumuliert, eine 5fache Steigerung gegenüber dem Gehalt der differenzierten Pflanze (ZENK et al., 1977).

Die Produktion von Nährstoffen in vitro ist nur eine Möglichkeit, die die Stoffwechselleistungen pflanzlicher Zellkulturen bieten. Die Fähigkeit der Zellen, eine zugefügte artsspezifische, artfremde oder sogar synthetische Verbindung chemisch zu verändern, ist ein weiterer vielversprechender Aspekt. Einerseits könnten natürlich vorkommende Zwischenprodukte durch kultivierte Zellen zu Verbindungen transformiert werden, die auch in der differenzierten Pflanze gefunden werden, dort aber in sehr viel geringeren Konzentrationen vorhanden sind. Andererseits könnten synthetische Verbindungen, Naturstoffanaloga oder Zwischenprodukte aus Stoffwechselwegen anderer Pflanzen in Produkte umgesetzt werden, die normalerweise von den Zellen des verwendeten Gewebes nicht gebildet werden. Die Biotransformation bietet daher die Möglichkeit, nützlichere Verbindungen zu produzieren als es die eingesetzten Substrate sind, und Substanzen zu bilden, die neue pharmakologisch interessante Eigenschaften besitzen.

Auch für die Biotransformation von Naturstoffen durch Zellkulturen sind Zellstämme notwendig, die sich durch besonders gute Stoffwechselleistungen auszeichnen. Gelingt es nicht mehr, allein durch Veränderung des Mediums eine weitere Steigerung der Naturstoffgehalte zu erreichen, kann die Selektion varianter Zellstämme eine hilfreiche Methode sein, um die Ausbeute an gewünschten Inhaltsstoffen zu erhöhen.

Ein allgemein bekanntes Phänomen, das besonders leicht an Kalluskulturen beobachtet werden kann, ist das spontane Auftreten morphologisch oder farblich veränderter Zellregionen innerhalb eines homogen wachsenden Zellverbandes. Diese varianten Zellbezirke bilden in Subkultur Zellstämme, die oft große Unterschiede in der Akkumulation der Inhaltsstoffe aufweisen und die Aus-

gangskultur gehaltsmäßig übertreffen können. Bei der Kultivierung von ungefärbten Kalluskulturen von Beta vulgaris traten nach einigen Passagen spontan rot gefärbte Gewebepartien auf. Durch selektive Vermehrung wurde aus diesen Regionen ein Gewebestamm etabliert, der reich an Betacyanen und Betaxanthin war und sich dadurch erheblich von dem Ursprungsgewebe unterschied (CONSTABEL, 1967). Eine ähnliche Beobachtung wurde an Pigment-führenden Kalluskulturen von Lithospermum gemacht. In den ersten Generationen nach Anlage der Kalluskultur bildeten sich Zonen von ganz farblosen und intensiv rot gefärbten Zellaggregaten, die dem Kallusgewebe ein mosaikartiges Aussehen verliehen. Auch hier war es möglich, diese Zonen getrennt weiter zu kultivieren und so den Shikoningehalt der erhaltenen Zellstämme positiv oder negativ zu beeinflussen. Einer dieser varianten Zellstämme hatte die Fähigkeit zur Shikoninsynthese vollständig verloren, während andere Gehalte aufwiesen, die dem der intakten Wurzel zu vergleichen waren (TABATA et al., 1976).

An diesen Beispielen wird deutlich, daß die Selektion von Zellstämmen mit erhöhter Naturstoffproduktion leicht möglich ist, wenn der erwünschte Stoff selbst intensiv gefärbt ist. Hilfreich für Selektionen kann auch das Auftreten eines "Signalfaktors" sein, wie es bei Gewebekulturen von Macleaya microcarpa beschrieben wurde (KOBELITZ et al., 1975). In diesen Kulturen fielen gelb gefärbte Zellen auf, die besonders reich an Alkaloiden (Protopin, Allokryptopin und Sanguinarin) waren. Die gelbe Färbung wurde nicht von Sanguinarin, sie kann auch in sanguinarinfreiem Gewebe auftreten, sondern von einer Substanz verursacht, die keinen Alkaloidcharakter besitzt. Trotzdem deutete ihre Anwesenheit immer auch auf einen hohen Alkaloidgehalt hin. Selektion von intensiv gefärbten Aggregaten führte daher auch zu alkaloid-

reichen Zellstämmen, deren Syntheseleistungen mit der der Gesamtpflanze vergleichbar waren.

Technisch aufwendiger ist die Selektion von Zellaggregaten mit ungefärbten Inhaltsstoffen, bei denen also ein unterschiedlicher Gehalt nicht optisch in Erscheinung tritt, besonders wenn innerhalb eines Screening-Programms eine große Anzahl an Proben getestet werden soll. Ein entscheidender Fortschritt auf diesem Gebiet konnte durch Anwendung des Radioimmunoassays (RIA) gemacht werden. Dieses Nachweisverfahren war ursprünglich in der klinischen Biochemie entwickelt worden (BERSON und YALOW, 1959) und wurde zum ersten Mal von WEILER (1977 a) zur Bestimmung eines Naturstoffes (Digoxin) in Pflanzenextrakten eingesetzt. Aufgrund seiner hohen Spezifität, Nachweisempfindlichkeit und Probenkapazität ist der RIA ein ideales Analyseverfahren, das vor allem ein effizientes Screening ungefärbter Pflanzeninhaltsstoffe ermöglicht (WEILER, 1977 a).

Durch Einsatz von Immuntests, die für die Indolalkaloide Serpentin und Ajmalicin erstellt worden waren (ARENS, 1976), konnten z.B. aus einer Zellpopulation einer einzigen Petrischale (160 Zellkolonien) von Catharanthus roseus Zellstämme isoliert werden, deren maximale Gehalte den der Ausgangspflanze um den Faktor 1,5 und den durchschnittlichen Gehalt von intaktem Wurzelgewebe um den Faktor 5 übertrafen (ZENK et al., 1977).

Grundlage für die erfolgreiche Selektion von Zellstämmen, deren Stoffwechselleistungen überdurchschnittlich hoch und auch der der intakten Pflanze überlegen sind, ist also das Auftreten von varianten Zellen oder Zellaggregaten innerhalb einer Zellpopulation. Viele Faktoren können Ursache für diese unterschiedlichen Fähigkeiten zur Naturstoffbildung sein. Durch Genmutationen oder

Chromosomenabnormalitäten können Enzymmuster der Zellen so verändert werden, daß Stoffwechselwege unterbrochen werden oder ganz ausfallen, während andere durch Verdopplung einzelner Chromosomen verstärkt vertreten sind. Dadurch könnten Zellen die Fähigkeit zur Bildung eines Inhaltsstoffes vollständig verlieren, oder aber andere vermehrt akkumulieren, eventuell auch dadurch, daß störende Abbaureaktionen blockiert werden. Die Isolierung von varianten Zellstämmen mit gesteigerter Produktbildung oder, was auch bedeutungsvoll sein könnte, mit reduziertem Gehalt eines unerwünschten Nebenproduktes, ist besonders in Hinblick auf die biotechnologische Nutzung pflanzlicher Gewebekulturen wichtig geworden.

Sind die Möglichkeiten dieser natürlich vorkommenden Variationen erschöpft, kann durch UV-Bestrahlung oder Behandlung mit mutagenen Agentien versucht werden, künstlich Regulationsmutanten zu erzeugen. Als Regulationsmutante bezeichnet man Organismen, bei denen im Gegensatz zum Wildtyp keine Endprodukthemmung eines Stoffwechselweges durch das gebildete Produkt eintritt. Durch Einsatz solcher Mutanten gelang es z.B., die fermentative Produktion von Aminosäuren durch Bakterienstämme stark zu erhöhen (YAMADA et al., 1972). Zur Erzeugung Aminosäure-überproduzierender Bakterienstämme werden häufig Aminosäureanaloge eingesetzt, die normalerweise toxisch auf die Zellen wirken. Resistente Mutanten können nach Behandlung mit dem Analogon aufgrund der Tatsache überlegen, daß sie zur gesteigerten Produktion der entsprechenden Aminosäure fähig sind und so das toxische Prinzip verdünnen. Auch diese in der Mikrobiologie gebräuchliche Technik ließ sich auf pflanzliche Zellkulturen übertragen. Aus Suspensionskulturen von Daucus carota ließen sich resistente Zellstämme gegen

das Aminosäureanalogen p-Fluorophenylalanin selektieren, deren Gehalt an freiem Phenylalanin und Tyrosin stark erhöht war (PALMER und WIDHOLM, 1975). Diese Stämme behielten auch nach mehreren Passagen in Hemmstoff-freiem Medium die Eigenschaft der Resistenz bei. Die Häufigkeit, mit der diese resistenten Linien auftraten, war äußerst gering; nur eine von $3,6 \times 10^6$ Zellen war gegen den Hemmstoff resistent.

Beide Tatsachen sprechen dafür, daß für die Resistenz der Daucus-Zellstämme eine Mutation verantwortlich war (PALMER und WIDHOLM, 1975).

Durch Behandlung mit mutagener Strahlung konnten resistente Zellstämme von Rosa damascena isoliert werden, die doppelten DNA-Gehalt und mehr Chromosomen enthielten als der Ausgangsstamm und zur 14fach gesteigerten Anreicherung von flavonoiden Verbindungen befähigt waren (MURPHY und HAMILTON, 1979).

Zur Erzeugung von Mutanten aus pflanzlichen Zellkulturen sind in den letzten Jahren auch vermehrt Protoplasten eingesetzt worden, pflanzliche Einzelzellen also, deren Zellwände mit Hilfe von Enzymen (Cellulasen, Pektinasen, Hemicellulasen oder Gemische dieser Enzyme) abgebaut worden sind.

Es ist möglich, aus Protoplasten Zellaggregate, Kalluskulturen (z.B. POTRYKUS et al., 1979) oder sogar ganze Pflanzen zu regenerieren (SCHIEDER, 1975; BOURGIN et al., 1979; WENZEL et al., 1979). Da dabei gewährleistet ist, daß alle Zellen des entstandenen Gewebeverbandes aus einer Zelle hervorgegangen sind, sollten sie genetisch homogen sein. Nach mutagener Behandlung, die zur Steigerung der Syntheseleistung für bestimmte Inhaltsstoffe führen kann, könnte so auch die Stabilität der Sekundärstoffbildung durch das gleiche genetische Potential aller

Zellen des varianten Stammes gefördert werden. Haploide Protoplasten sind besonders gut geeignet zum Isolieren von Mutanten mit rezessiven Merkmalen, besonders wenn sich die Mutation in veränderter Pigmentierung ausdrückt (SCHIEDER, 1976). Solche Mutanten können dann wiederum bei Versuchen zur somatischen Hybridisierung als "marker" dienen. Die Abwesenheit der Zellwände ermöglicht die Fusion von Protoplasten, sogar zwischen sexuell nicht kreuzbaren Arten. Die Bildung von genetisch neu kombinierten Pflanzen durch Fusion von somatischen Zellen ist daher besonders für die Züchtungsforschung interessant (GLEBA et al., 1978; MENCZEL et al., 1978). Darüber hinaus bieten Protoplasten viele Möglichkeiten für physiologische Untersuchungen, so zum Beispiel zum Studium der Zellwandbildung (MISHRA und ARORA, 1978), der Hormonwirkungen (SCHNABL et al., 1978), der Aufnahme von fremden Zellorganellen (LÖRZ und POTRYKUS, 1978) oder exogener DNA (BEHKI und LESLEY, 1979; MÁRTON et al., 1979). Nach Abbau der Zellwände und anschließender Untersuchung der Enzymaktivitäten in den Protoplasten können Informationen über Lokalisation von bestimmten Enzymen in der Zellwand erhalten werden. Durch schonende Trennung von Cytosol und Vakuolen aus Protoplasten von Hippeastrum konnte nachgewiesen werden, daß die drei wichtigsten Enzyme für die Flavonoidbiosynthese (Flavanon-Synthase, Chalkon-Flavanon Isomerase, UDP-Glucose Anthocyanidin-3-O-Glucosyltransferase) im Cytosol, nicht in der Vakuole lokalisiert sind (HRAZDINA et al., 1978). Bei Protoplasten ist das Cytoplasma nur durch das Plasmalemma vom umgehenden Medium getrennt; sie eignen sich daher gut zur Untersuchung von Transportvorgängen an der Membran. Substanzen können dem Medium zugesetzt werden und sind dann dem Protoplasten leichter zugänglich als bei Zellen im Gewebeverband (BRISKIN und LEONARD, 1979).

Untersuchungen zu Transportvorgängen an Membranen schließen auch den Tonoplasten als Untersuchungsobjekt ein, seitdem es gelungen ist, aus Protoplasten Vakuolen zu isolieren. Vakuolen als größte der Zellorganellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Zellkompartimentierung und Ablagerung von Stoffwechselprodukten. Durch den Tonoplasten werden anabolische und katabolische Prozesse innerhalb der Zelle getrennt, er ist damit für den ungestörten Ablauf physiologischer Prozesse verantwortlich. So sind zum Beispiel die Senföle der Cruciferen als wasserlösliche, unschädliche Glucosinolate in den Vakuolen der Wurzelzellen lokalisiert und damit räumlich von dem spaltenden Enzym Myrosinase getrennt. Myrosinase würde bei direktem Kontakt die harmlosen Glucosinolate sofort in die toxischen Senföle umsetzen und dadurch Zelltod herbeiführen (GROB und MATILE, 1979). Durch Erarbeitung schonender Methoden zur Isolierung von Vakuolen (GROB und MATILE, 1979; SAUNDERS und CONN, 1978; METTLER und LEONARD, 1979; SASSE et al., 1979) ist es möglich geworden, die Lokalisation von Inhaltsstoffen oder Enzymen, die Fähigkeit zur Aufnahme und Akkumulation von Stoffwechselprodukten durch die Vakuole und die Transporteigenschaften des Tonoplastes zu studieren. Da Pflanzenzellen in Kultur gehalten ihre Stoffwechselprodukte normalerweise nicht in das Medium abgeben, sondern in der Vakuole deponieren, sind daher die regulatorischen Prozesse im Cytoplasma und die Aufnahmekapazität der Vakuolen für einen bestimmten Naturstoff ein wesentlicher Faktor für die Produktionsfähigkeit einer Zellkultur (ZENK, 1978 a), ein Phänomen, das bisher kaum untersucht werden konnte. Wäre es möglich, diese natürliche Begrenzung der Stoffwechselleistungen zu umgehen, indem man die Zellen durch schonende

chemische Behandlung dazu veranlaßt, ihre Inhaltsstoffe in das Medium abzugeben, ohne dabei eine Zellschädigung herbeizuführen, um sie danach zur erneuten Produktbildung anzuregen, wäre das ein bedeutender Fortschritt für die biotechnologische Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellkulturen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigten sich in erster Linie mit Kallus- und Suspensionskulturen von Catharanthus roseus. Aus der intakten Pflanze wurden bisher über 70 Alkaloide isoliert und identifiziert (SVOBODA, 1975). Für Suspensionskulturen konnte inzwischen bewiesen werden, daß die Alkaloidanreicherung von Serpentin und Ajmalicin den Gehalt der intakten Pflanze eindeutig übertraf (ZENK et al., 1977). Das Indolalkaloid Ajmalicin (Raubasin), das außer in Catharanthus-Arten auch u.a. in Rauwolfia-Arten gefunden wird, spielt eine bedeutende Rolle bei der Therapie von Kreislauferkrankungen. Es dient zur Verbesserung der Organdurchblutung (STEINEGGER und HÄNSEL, 1972) und wird bei cerebralen und peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen angewendet. In Kombination mit Reserpin und Rescinnamin wirkt es als Antihypertonicum. Zur arzneilichen Verarbeitung wird weniger Ajmalicin selbst als vielmehr Serpentin aus den getrockneten Wurzeln der Pflanzen gewonnen und industriell mit NaBH_4 zu Ajmalicin reduziert.

Ein Hauptalkaloid von Catharanthus roseus ist das Vindolin, das zusammen mit Catharanthin Baustein der dimeren Indolbasen von Monoterpenoidtypus ist. Diese dimeren Alkaloide, besonders Vinblastin und Vincristin, haben aufgrund ihrer starken onkolytischen Wirkung größtes Interesse erlangt und werden u.a. zur Therapie der Hodkin'schen Krankheit und Leukämie eingesetzt. Das Vorkommen von Vindolin konnte in crown-gall-Gewebe (BODER et al .

1964) und in Kalluskulturen von Catharanthus roseus (RICHTER et al., 1965) wahrscheinlich gemacht werden. Eine steigende Nachfrage nach diesen Inhaltsstoffen könnte eventuell durch Gewinnung der Alkaloide aus Gewebekulturen befriedigt werden.

Ein weiteres Studienobjekt waren Suspensionskulturen von Eschscholtzia-Arten, die zu der Familie der Papaveraceae gehören. Die Grundstruktur der bisher aus Eschscholtzia-Pflanzen isolierten Alkaloide ist das Benzylisochinolin, von dem sich die Alkaloide vom Protopin-, Benzophenantridin-, Pavin-, Aporphin- und Berberintyp ableiten. Vertreter dieser Alkaloidgruppen haben spasmolytische, sedative oder narkotische Wirkung, werden zur Therapie von Herzrhythmusstörungen eingesetzt und sind außerdem Bestandteile von Beruhigungsmitteln.

Gewebekulturen der Rubiaceae Morinda citrifolia sind intensiv gelb gefärbt. Ihre Zellen enthalten Anthrachinone als Glykoside oder Aglyka in den Vakuolen gespeichert. Anthrachinonglykosidhaltige Pflanzen hatten früher als Quelle für Anthrachinonfarbstoffe große wirtschaftliche Bedeutung (Alizarin aus der Krappwurzel). Heutzutage hat das kommerzielle Interesse nachgelassen, da diese Farbstoffe leicht synthetisch hergestellt werden können. Für Erforschung verschiedener Gewebekulturtechniken haben sich jedoch Zellkulturen aus Rubiaceae als Modellpflanzen sehr bewährt (SCHULTE, 1978). Variationen in der Anthrachinonbildung, zum Beispiel nach Applikation von Vorstufen oder geänderter Medienzusammensetzung, lassen sich sofort an der veränderten Färbung des Gewebes in der Kultur erkennen, ein Vorteil, der besonders die Selektion von Zellkolonien begünstigt.

Die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sollten sich mit den Möglichkeiten befassen, die die Stoffwechselleistungen einer Population von Zellen einer pflanzlichen Zellkultur bieten. Durch Anwendung neuer Selektionsmethoden sollte überprüft werden, ob es gelingt, den Sekundärstoffgehalt schon in der lebenden Zelle zu erfassen, um so Zellstämme mit varianten Stoffwechselleistungen zu etablieren. Durch kinetische Untersuchungen der Produktbildung und der enzymatischen Aktivitäten zur Biosynthese ihrer Inhaltsstoffe sollten die Eigenschaften dieser varianten Stämme charakterisiert werden. Durch Chromosomenuntersuchungen von Zellstämmen mit verschiedener biochemischer Potenz sollte versucht werden, Informationen über die Ursache der Varianz zu erhalten.

Ferner sollte überprüft werden, welchen Einfluß die Applikation von Effektoren, von Vorstufen der Sekundärstoffbiosynthese oder von Hemmstoffen - wie Aminosäureanaloge - auf die Stoffwechselleistungen der Zellkulturen ausüben können, und wie weit die Produktionskapazität dadurch gesteigert werden kann.

Mit Hilfe von isolierten Protoplasten und Vakuolen sollten Enzyme und Produkte innerhalb der Zellen lokalisiert werden und durch Untersuchungen zur Aufnahme von Sekundärstoffen in die Vakuolen Hinweise auf die Fähigkeiten und Mechanismen der Zellen zur Akkumulation ihrer Inhaltsstoffe erhalten werden. Die mögliche Anwendung einer in der Mikrobiologie gebräuchlichen Technik, die Immobilisierung von Enzymen oder kompletten Mikroorganismen (MOSBACH, 1976), sollte an kultivierten Pflanzenzellen untersucht und die Stoffwechselleistungen dieser eingeschlossenen Zellen getestet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial und Zellkulturtechniken

1.1. Herkunft der verwendeten Zellkulturen und Pflanzen

Aus sterilen Keimlingen von Catharanthus roseus (L.) G. Don waren im Rahmen dieser Arbeiten im Herbst 1975 Kalluskulturen und daraus Suspensionskulturen angelegt worden. Zellen einer gut produzierenden Suspensionskultur wurden plattiert und aus den herangewachsenen Kalli im Frühjahr 1976 eine Reihe von Zellstämmen angelegt, die als Suspensionskulturen für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

Kallus- und Suspensionskulturen von Eschscholtzia californica CHAM., Eschscholtzia douglasii (Hook et Arn.) Walp. und Eschscholtzia tenuifolia Hook f. wurden aus steril gekeimten Samen herangezogen. Das verwendete Samenmaterial stammte aus verschiedenen Botanischen Gärten Europas.

Die Samen zur Anlage von Zellkulturen von Ruta chalepensis L. wurden von folgenden Botanischen Gärten zugeschickt: Hortus Botanicus Nationalis Belgii, Hortus Botanicus Kosice-CSSR und Hortus Botanicus Universitatis Nijmegen.

Morinda citrifolia L. Zellkulturen wurden aus Explantaten einer Pflanze aus dem Gewächshaus (Bochum) angelegt.

Kulturen des Stammes DL GÖ 20 W von Digitalis lanata EHRH. waren 1974 aus steril gekeimten Samen (S_1) einer Pflanze (aus Saatgut des Botanischen Gartens Göttingen) herangezogen worden (WEILER, 1977 a).

Kalluskulturen von Datura meteloides waren aus Blattspitzen einer aus Antheren regenerierten Pflanze angelegt und im Juni 1980 in Submerskultur gebracht worden.

Suspensionskulturen von Rauwolfia serpentina (L.) Benth. ex. Kurz, Nicotiana sylvestris SPEGAZZ et COMES, Daucus carota L. und Duboisia myoporoides wurden aus der Zellkultursammlung des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung von Vakuolen aus Mesophyll-Protoplasten wurden Datura sanguinea und Catharanthus roseus Pflanzen aus dem Gewächshaus verwendet.

1.2. Medien

Für die Kultivierung von C. roseus, R. serpentina, D. meteloides und der Eschscholtzia-Arten wurde das Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) mit 10^{-6} M, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 10^{-6} M Naphtylessigsäure, pH 6.0 verwendet. Für Kalluskulturen wurden 8 g Difco Bacto-Agar pro ein Liter Medium zugegeben. Als Produktionsmedium für C. roseus wurde das Basalmedium nach RINGE (1972) mit 5×10^{-6} M N^6 -Benzyladenin und 10^{-6} M Indolessigsäure, pH 5.0 eingesetzt. Zur Kultivierung von Kalluskulturen wurde für dieses Medium 7 g/l Agar benötigt. R. chalepensis, N. sylvestris und D. myoporoides wuchsen in dem Medium nach GAMBOG et al. (1968), das durch Zugabe von 0,2 % N-Z-Amin Typ A (Sheffield Chemical, Norwich, N.Y.) und 10^{-5} M 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 3×10^{-6} M 1-Naphtylessigsäure, 3×10^{-6} M 3-Indolessigsäure und 10^{-6} M Kinetin ergänzt worden war. Für Kulturen von Morinda citrifolia wurde diesem Medium außer N-Z-Amin nur 10^{-5} M 1-Naphtylessigsäure, für Daucus carota nur 5×10^{-6} M 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure zugegeben.

Suspensionskulturen von Digitalis lanata benötigten das Medium von NITSCH und NITSCH (1969) unter Zugabe von 30 % Cocosmilch.

1.3. Sterilisationsverfahren

Medien in den Kulturgefäßen, Glasgeräte und Büchnertrichter wurden bei einem Betriebsdruck von 1,2 atü und 120° C für 25 Minuten autoklaviert. Pinzetten, Lanzettnadeln, Spatel und graduierte Löffel zum Übertragen von Gewebe wurden vor der Verwendung über einer Gasflamme ausgeglüht. Pipetten wurden in Aluminiumhüllen zum Sterilisieren 5 Stunden bei 260° C im Sterilschrank aufbewahrt.

1.4. Animpfen von Schüttenkolben

Suspensionskulturen, die der Erhaltung dienten, wurden durch Übertragen von 30 ml Zellsuspension in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 70 ml frischem Medium angeimpft. Für Versuchskulturen wurden 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium verwendet. Zellen aus Kulturen in stationärer Wachstumsphase wurden in einem Büchnertrichter mit eingelegtem Nylonnetz (Monodur 100, Polyamid normal, Maschenweite 100 µ, Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld) vom Medium getrennt und 1 - 2 cm³ des Gewebes als Inoculum pro Kolben eingesetzt.

1.5. Plattierungsvorgang

Für Mutations- und Selektionsexperimente sollte eine gleichmäßige Verteilung kleiner Zellaggregate in festem Medium erreicht werden. Um die plattierten Zellen auch

bei geringer Zelldichte zur Teilung bringen zu können, wurde zum Plattieren 50 % konditioniertes Medium verwendet. Zur Konditionierung wurde das gewünschte Medium mit Gewebe angeimpft (5 cm^3 pro 500 ml) und 10 Tage kultiviert. Anschließend wurde das herangewachsene Gewebe unter sterilen Bedingungen vom Medium getrennt. Zu 250 ml dieses zellfreien Mediums wurden 2 - 4 cm^3 des zu plattierenden Gewebes hinzugegeben, anschließend mit frisch autoklaviertem, auf ca. 40°C abgekühltem Agarmedium (mit doppelter Agarkonzentration) vermischt und sofort als dünne Schicht in Petrischalen ($\varnothing$ 9 cm, Firma Urbanti) ausgegossen. Nachdem das Medium erstarrt war, wurden die Petrischalen zum Verdunstungsschutz mit Parafilm verschlossen.

1.6. Kulturbedingungen

Suspensionskulturen, die der Stammerhaltung dienten, wurden bei 23°C im Dauerlicht (600 Lux) und 70 % Luftfeuchtigkeit mit 100 rpm auf Rotationsschüttlern (New Brunswick Scientific) kultiviert. Im Abstand von 8 (N. sylvestris), 10 (C. roseus, D. lanata, R. serpentina, D. carota, D. myoporoides, D. meteloides) und 14 Tagen (R. chalepensis, M. citrifolia, Eschscholtzia-Arten) wurde Gewebe in frisches Medium übertragen. Versuchskulturen von C. roseus wurden bei 30°C im Dunkeln bei 70 % Luftfeuchtigkeit und 100 rpm kultiviert. Bei Versuchen, die mit M. citrifolia, R. chalepensis, D. lanata und den Eschscholtzia-Arten durchgeführt wurden, entsprachen die Bedingungen denen der Erhaltungskulturen. Kalluskulturen von C. roseus wurden in Petrischalen ($\varnothing$ 5 cm, Firma Urbanti) bei 30°C und 70 % Luftfeuchtigkeit erhalten, für Kalluskulturen von R. chalepensis und der Eschscholtzia-Arten betrug die Kultivierungstemperatur 23°C . Im Abstand von 3 - 4

Wochen erfolgten Passagen auf frisches Agarmedium. Petrischalen mit plattierten Zellen wurden im Dunkeln bei 25° C und 80 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2. Messung verschiedener Wachstumsparameter

2.1. Frisch- und Trockengewichtsbestimmung

Durch Vakuumfiltration wurde das Gewebe vom Medium getrennt, mit Aqua dest. gewaschen und gewogen. Zum Trocknen wurden die Zellen 48 Stunden bei 55° C aufbewahrt, anschließend ausgewogen und das Trockengewicht bezogen auf 1 l Medium berechnet. Zur Bestimmung des Trockengewichtes von Zellkolonien wurde von 50 Kolonien jeweils Frisch- und Trockengewicht bestimmt, die Mittelwerte gebildet und die Trockengewichte getesteter Kolonien an Hand dieser Werte berechnet.

2.2. Charakterisierung der Parameter im Medium

Die Untersuchungen des Kulturmediums konnten nach Abfiltrieren der Zellen ohne weiteren Reinigungsschritt durchgeführt werden. Zur Saccharosebestimmung wurde ein Abbé-Refraktometer der Firma Zeiss verwendet. Der Nitratgehalt wurde mit einer Nitratelektrode gemessen (Modell 92-07, Orion Research Inc., Cambridge, Mass. USA) und aus einer zuvor mit Natriumnitrat wechselnder, aber bekannter Konzentrationen erstellten Eichgerade berechnet. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät der Firma Püsl, München, bestimmt und pH-Werte am pH-Meter der Firma Radiometer, Copenhagen gemessen. Die NH_3 -Bestimmung erfolgte mit der Mikro-kjeldahlmethode (nach: BELOSERSKI und PROSKURJAKOW, 1956).

3. Quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe

3.1. Extraktionsverfahren

Für die Gehaltsbestimmung von Kallus- und Suspensionskulturen werden 1 - 2 g Gewebe (Frischgewicht) in 25 ml siedendem Äthanol (80 %) unter Rückflußkühlung auf der Heizplatte 30 Minuten extrahiert. Nach dem Abkühlen wurden die Zellen vom Extrakt abfiltriert, und die Extrakte vor der Untersuchung genau auf 25 ml aufgefüllt. Extrakte von Zellkolonien wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt. Nach Bestimmung des Frischgewichts wurden zu je einer Kolonie pro Gefäß 0,2 ml Äthanol zugegeben, und das Gewebe mit einem Mikrospatel im Alkohol suspendiert. Danach wurden die Gefäße fest verschlossen und über Nacht im Trockenschrank bei 60° C inkubiert.

3.2. Chromatographische Analysen und quantitative Auswertung

Zur chromatographischen Untersuchung der Extrakte wurden mit einer Unimetrics-Spritze 25 - 100 µl Extrakt punktförmig auf DC-Fertigplatten aufgetragen (DC-Karten SI F, Kieselgel mit Fluoreszenzindikator 254 nm, auf Aluminiumkarten, Schichtdicke 0,2 mm, Riedel-De Haen AG). Chromatogramme von R. chalepensis Extrakten wurden in folgenden Laufmitteln entwickelt:

- (I) Cyclohexan-Chloroform-Diäthylamin 60:30:10
- (II) Chloroform-Methanol 98:2
- (III) Benzol-Äthanol 90:10

Zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide in Extrakten von C. roseus Zellkulturen wurden Vergleichslösungen

bekannter Alkaloidkonzentrationen auf die Fertigplatten mit aufgetragen. Als Vergleichslösungen dienten alkoholische Lösungen der Alkaloide Serpentin (0,4 µg in 20 µl), Ajmalicin (1 µg in 25 µl) und Tetrahydroalstonin (1 µg in 10 µl). Die Alkaloide stammten von der Firma Boehringer, Mannheim. Für die Serpentinbestimmung wurden die DC-Platten in dem Laufmittel (IV) Chloroform-Aceton-Diäthylamin 50:40:10 (STAHL, 1967) entwickelt. Ajmalicin und Tetrahydroalstonin wurden im Laufmittel (V) Chloroform-Aceton-n-Hexan 25:20:38 aufgetrennt. Nach dem Entwickeln wurden diese Chromatogramme eine Stunde lang bei 115° C getrocknet und anschließend mit dem Chloramin-T-Trichloressigsäure-Sprühreagenz (WALDI, 1959) behandelt. Das Sprühreagenz bewirkte Intensivierung der Fluoreszenz der Ajmalicin-Isomere, so daß die fluorimetrische Auswertung erleichtert wurde.

Die chromatographischen Untersuchungen der Extrakte von Eschscholtzia-Arten und die dabei verwendeten Vergleichssubstanzen werden unter Punkt 4 beschrieben.

Die quantitative Bestimmung der Alkaloide nach der Dünnschichtchromatographie wurde mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 (Carl Zeiss) durchgeführt, das zur Fluoreszenzanregung mit einer Deuteriumlampe und zur Unterdrückung der Anregungsstrahlung mit dem Sperrfilter FL 43 oder FL 56 ausgerüstet war. Serpentin wurde bei einer Anregungswellenlänge von 309 nm, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin bei 365 nm gemessen. Die gemessene Fluoreszenz wurde durch einen Potentiometerschreiber Servogor S als Kurve aufgezeichnet. Aus der Höhe der Maxima und der eines bekannten Vergleichspunktes wurde die in der unbekannten Probe enthaltene Alkaloidmenge berechnet.

3.3. Radioimmunoassay

Sollten die Alkaloidgehalte einer großen Probenzahl ermittelt werden, wurden Radioimmuntests durchgeführt. Die Alkaloidbestimmung mit dem RIA beruht auf alkaloidspezifischen Antikörpern, die im Test zusammen mit einer konstanten Menge radioaktiv markierter Antigene und der entsprechenden Probe mit unbekannter Antigenmenge (die zu bestimmenden Alkaloide) inkubiert werden. Dabei konkurrieren beide Antigene um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Antikörperbindungsstellen. Die nicht gebundenen Antigenmoleküle werden nach der Inkubation von den entstandenen Antigen-Antikörperkomplexen getrennt und die Radioaktivität dieser Komplexe gemessen. An Hand einer Standardkurve kann der Alkaloidgehalt aus der verbliebenen gebundenen Radioaktivität berechnet werden. Radioimmuntests wurden zur Bestimmung von Serpentin, Ajmalicin und Loganin/Secologanin in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Weiler am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität durchgeführt. Herrn Dr. Weiler und seinen Mitarbeitern Fräulein A. Roder und Herrn J. Kwiatkowski sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

3.4. Photometrie

Die Extinktionsbestimmung der Anthrachinone in Extrakten von M. citrifolia wurde nach geeigneter Verdünnung im Spektrophotometer (Hitachi, Modell 101) bei 434 nm durchgeführt. Zur Berechnung der Anthrachinonkonzentrationen wurde der molare Extinktionskoeffizient von Alizarin ($\epsilon = 5500 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ bei 434 nm) eingesetzt (ZENK et al., 1975).

4. Alkaloidisolierung und Identifizierung

4.1. Gewebeaufarbeitung

Zur Charakterisierung der Alkaloide in Gewebekulturen verschiedener Eschscholtzia-Arten wurde ein Gewebenaufschlußverfahren gewählt, das sich an den Methoden von SLAVIK und SLAVIKOVA (1979) und MANSKE und SHIN (1965) orientierte. Das zur Aufarbeitung verwendete Gewebe von E. californica wurde nach 10tägiger Kultivierung vom Medium abfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20° C gelagert. 3 kg Zellmaterial wurden mit 7,5 l Weinsäure (2 %ig) 3 Tage bei 50° C unter langsamem Rühren aufgeschlossen und der gewonnene Extrakt anschließend durch mehrmaliges Filtrieren über Perlonnetz (Monodur 100), Papiervlies (Miracloth, Calbiochem, Los Angeles, USA) und Filterpapier (Schleicher & Schüll) gereinigt. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bis auf 1 l eingeeengt und danach zur Adsorption der verbliebenen Trübstoffe 300 ml heißes Paraffin zugegeben und 2 Stunden bei 100° C gerührt. Nach dem Abkühlen ließ sich das ausgehärtete Paraffin von dem nun klaren Extrakt trennen. Durch Zugabe von Natriumcarbonat wurde der Extrakt alkalisch gemacht (pH 9 - 10) und zuerst mit Äther (Fraktion A) und danach mit Chloroform (Fraktion E) ausgeschüttelt. Zu der verbliebenen wäßrigen Phase wurde Natriumhydroxid zugegeben bis der pH-Wert 11 erreicht worden war. Durch erneutes Ausschütteln mit Äther wurde Fraktion B gewonnen. Die erhaltenen Fraktionen A, B und E wurden chromatographisch untersucht. Zur chromatographischen Analyse wurden außerdem alkoholische Extrakte verwendet, die wie unter Punkt 3.1 beschrieben, hergestellt worden waren.

4.2. Chromatographische Analyse

Zur Auftrennung der Fraktionen A, B und E wurde die Methode der präparativen Schichtchromatographie verwendet. Dünnschichtplatten von 0,5 mm Schichtdicke (Kieselgel G, Merck) wurden in den Laufmitteln (V) (VI) Essigester-Butanon(2)-Ameisensäure-H₂O 5:3:1:1 (VII) Aceton-Methanol-Diäthylamin 1:1:0.2 entwickelt. Zur Untersuchung der alkoholischen Extrakte wurden verschiedene Dünnschichtfertigplatten verwendet. Außer den unter Punkt 3.2 angegebenen DC-Karten wurden Kieselgel-Fertigplatten auf Plastikunterlage (Macherey & Nagel, 0,25 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator UV₂₅₄) und HPTLC-Fertigplatten mit Konzentrationszone für die Chromatographie im Nano-Bereich (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt) eingesetzt und in den Laufmitteln V-VII entwickelt.

Die zur chromatographischen Analyse notwendigen Vergleichssubstanzen waren freundlicherweise von Prof. Dr. J. Slavik (Brünn, CSSR) und Dr. N. Nagakura (Kobe, Japan) zur Verfügung gestellt worden. Ihnen sei an dieser Stelle für ihre Hilfe gedankt.

4.3. Spektroskopie

Zur Identifizierung isolierter Substanzen wurden Absorptionsspektren am Beckman-Spektrophotometer (Modell 24) Infrarot-Spektren am Infrarot-Spektrophotometer (Perkin-Elmer, Modell 257) und Massenspektren am Gerät der Firma Varian (GC/MS System MAT 111, 80 eV) aufgenommen. Herrn Dr. J. Stöckigt vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität sei herzlich für die Anfertigung der Massen- und Infrarot-Spektren gedankt.

5. Mikroskopie

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden am Zeiss-Photomikroskop II (Carl Zeiss, Oberkochen) und am Zeiss-Forschungsmikroskop Standard WL durchgeführt.

5.1. Bestimmung von Zellzahl und Zellgröße

Die Zahl der Zellen in einem ml Kulturmedium und die Anzahl der Zellen eines Aggregates wurden in einem Haemocytometer (Neubauer, Hell Linie, Assistent) bestimmt. Dafür wurden je 10 Proben untersucht und der Mittelwert gebildet. Die Zellgröße und die Länge der Zellfäden wurde mit einem zuvor geeichten Meßokular (Carl Zeiss, Kpl 8x) gemessen. Auch für diese Bestimmungen wurden die mittleren Meßwerte von mindestens 10 Parallelproben ermittelt.

5.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen war das Photomikroskop mit einem Fluoreszenzauflichtkondensor III/RS (Carl Zeiss) und das Standardmikroskop mit einem Auflichtkondensor IV/F ausgerüstet. Als Erregerlichtquelle wurde in beiden Fällen eine Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 W verwendet. Für die selektive Fluoreszenzanregung im UV-Bereich diente die Filterkombination G365-FT395-LP420, Blau-Anregung wurde durch die Filterkombination G436-FT510-LP520 erreicht.

5.3. Filmmaterial

Für alle photomikroskopischen Aufnahmen wurden die Filme der Firma Kodak, High Speed, Ektachrome EH 135-20, Asa 160, 23 DIN verwendet. Die notwendigen Belichtungszeiten wurden automatisch von der Kamera gesteuert.

5.4. Färbeverfahren

Zur Untersuchung der Chromosomenzahlen verschiedener Stämme war eine Vorbehandlung der Zellen notwendig, um den jeweiligen Strukturzustand der Zellen zu erhalten und zu stabilisieren (RUTHMANN, 1966). Nach dem Abfiltrieren des Mediums wurde das Gewebe mehrmals mit Aqua dest. gewaschen und danach 3 Stunden in 2 mM 8-Hydroxychinolin inkubiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült und eine Stunde mit einer Fixierlösung aus Chloroform-Äthanol-Eisessig (6:3:1) fixiert. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen in 45 %iger Essigsäure eingefroren (Prof. Tabata, persönliche Mitteilung).

Die Färbung der Chromosomen wurde nach der von DARLINGTON und LA COUR (1963) beschriebenen Methode mit Carminessigsäure durchgeführt. Auf einem Objektträger wurde zu einer Gewebeprobe ein Tropfen Carminessigsäure gegeben und das Präparat über offener Flamme vorsichtig kurz erhitzt. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt und das Präparat zwischen Filterpapierlagen kräftig gequetscht. Nach dieser Behandlung ließen sich dunkelrot gefärbte Chromosomen in den Präparaten feststellen.

6. Selektionsverfahren

Einzelzellen und kleine Zellaggregate einer Suspensionskultur wurden in geeignetem Medium plattiert (vgl. 1.5) und kultiviert, bis sie zu Kolonien von 2 - 3 mm Durchmesser herangewachsen waren. Zur anschließenden Selektion waren sterile Bedingungen erforderlich, so daß das Standardmikroskop in der Querstrombank (BSH Laminargeräte) aufgestellt werden mußte. Um weiterhin eine Kontamination zu vermeiden, wurden Objektive, Objektivrevolver und Kreutztisch durch Abwischen mit 80 %igem Äthanol sterilisiert. Die Petrischalen mit den herangewachsenen Kolonien wurden bei geöffnetem Deckel unter dem Mikroskop untersucht. Bei geeigneter Anregungswellenlänge (vgl. II. 5.2. und III. 4.) wurden Zellkolonien selektiert, die überdurchschnittlich intensiv fluoreszierten oder sich in der Farbe der Fluoreszenz eindeutig von den übrigen Kolonien dieser Population unterschieden. Mit Hilfe einer Lanzettnadel wurden diese Kolonien von dem Agar der Petrischale abgehoben und zur weiteren Kultivierung in je eine Kammer einer Mikrotiterplatte (steril zu beziehen durch C. A. Greiner und Söhne, Nürtingen, Größe: 8 x 12 cm mit 96 Vertiefungen in U-Form, mit dazugehörigen sterilen Abdeckplatten) überführt. Die Kammern der Mikrotiterplatten waren zuvor je zur Hälfte mit konditioniertem Agarmedium gefüllt worden. Die Platten wurden mit einem entsprechenden sterilen Deckel verschlossen, gut mit Parafilm abgedichtet und bei 30° C im Dunkeln kultiviert. Während der Kultivierung konnte die Fluoreszenzintensität der selektierten Kalli auch bei geschlossenem Deckel untersucht und so fortwährend beobachtet werden. Nachdem die Kolonien herangewachsen waren, wurden sie in Petrischalen als Kallusstämme kultiviert, von denen Suspensionskulturen angelegt werden konnten.

7. Enzymtests

7.1. Aufschluß des Gewebes

Zur Untersuchung der Indolalkaloidsynthese im zell-freien System wurden Zellen mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im gefrorenen Zustand in der IKA-Analysenmühle aufgeschlossen. Anschließend wurden 10 g Zellmaterial mit 10 g Polyclar AT und 30 ml Boratpuffer (0,1 M, pH 7.0 mit 20 mM Mercaptoäthanol) 15 Minuten im Eisbad gerührt und danach abzentrifugiert (48000 x g, 10 min, 4° C). Der klare Überstand wurde abdekantiert und von 0 - 35 % und 35 - 60 % Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Nach der zweiten Fällung wurde das Präzipitat in 2 ml Boratpuffer aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 g Dowex 10 Minuten gerührt. Durch anschließendes Filtrieren über Glaswolle wurde der Enzymextrakt gereinigt und konnte zur Aktivitäts- und Proteinbestimmung eingesetzt werden.

Für die Untersuchung der Strictosidin-Synthase Aktivität wurde in Abwandlung zu der oben beschriebenen Aufschlußmethode eine Ammoniumsulfatfällung von 35 - 50 % Sättigung gemacht und der nach der Dowex-Behandlung gewonnene Enzymextrakt zusätzlich mit Dextran-beschichteter Holzkohle behandelt (TREIMER und ZENK, 1979 b).

Für den Vergleich der Enzymaktivitäten in Zellen, Protoplasten und Vakuolen wurde das verwendete Zellmaterial mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit doppelter Menge Aufschlußpuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5; 0,1 M Boratpuffer, pH 7.6) im Eisbad 30 Minuten gerührt und anschließend abzentrifugiert (48000 x g, 10 min, 4° C). Der klare Überstand (Rohextrakt) wurde zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Zur Gewinnung des Enzymrohextraktes aus isolierten Vakuolen wurde die gewonnene Vakuolensus-

pension mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und nach dem Wiederauftauen 30 Minuten im Eisbad gerührt. Es wurde kein Puffer zugesetzt, um ein Verdünnen der enthaltenen Enzyme zu vermeiden. Da sich ein anschließendes Abzentrifugieren erübrigte, konnte der so gewonnene Rohextrakt sofort zum Bestimmen der Enzymaktivitäten eingesetzt werden.

7.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten

7.2.1. Zellfreie Synthese von Indolalkaloiden

Die enzymatische Aktivität zur Bildung der Indolalkaloide wurde durch folgende Inkubationsansätze bestimmt: 1250 nMol Secologanin, 250 nMol Tryptamin, 0,2 μ Ci 14 C-Tryptamin, 50 μ Mol Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0), 1 μ Mol NADPH und 1 mg Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml 120 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Test wurde durch Auftragen von Proben des Ansatzes auf Dünnschichtplatten (Sil G/UV₂₅₄, Macherey & Nagel) abgestoppt. Die Chromatogramme wurden im Laufmittel (VIII) Petroleumäther (40-60°C)-Aceton-Diäthylamin (70:20:10) entwickelt und die Radioaktivität der im Ansatz enthaltenen Alkaloide mit einem Dünnschichtscanner gemessen. Die Bildung von Cathenamin wurde in einem Testansatz ohne Zugabe von NADPH untersucht, der anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet wurde.

7.2.2. Strictosidin-Synthase

Für die Aktivitätsbestimmung der Strictosidin-Synthase wurde 2- 3 H-Tryptamin und Secologanin als Substrate eingesetzt. Bei der Kondensation von 2- 3 H-Tryptamin und Secologanin wird das Tritiumatom in Position 2 vom Indol-

ring abgespalten und dabei wird in der stöchiometrisch verlaufenden Reaktion markiertes Wasser freigesetzt. Um die Aktivität des entstandenen Wassers messen zu können, mußte es zuvor vom übrigen Inkubationsansatz getrennt werden. Dafür wurden zwei Methoden angewendet. Durch Erwärmen (IR-Licht) von Proben des Inkubationsansatzes, die auf Filterpapier aufgetragen worden waren, und anschließender Sublimation des verdunsteten markierten Wassers in einem Szintillationsglas konnte die bei der Entstehung von Strictosidin freigewordene Radioaktivität gemessen werden (TREIMER, 1979).

Bei der zweiten Methode wurde die Reaktion durch Zugabe von Holzkohle zu den Inkubationsansätzen abgestoppt. Durch die Holzkohle wurden alle gelösten aromatischen Moleküle aus dem Reaktionsansatz absorbiert. Anschließend wurde die Holzkohle durch Sedimentation entfernt und die Radioaktivität des wäßrigen Überstandes gemessen (SEIPEL, 1979). Für die Bestimmung der Strictosidin-Synthase Aktivität wurde folgender Test eingesetzt: 10 µl 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.5), 1,2 µMol Secologanin (Boehringer, Mannheim), 0,09 µMol 2-³H-Tryptamin (99 nCi) wurden 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde der Test durch Zugabe von 0,3 ml Aktivkohle (1 g/50 ml) abgestoppt, die Reaktionsgefäße in einem Mischer (5432) der Firma Eppendorf 1 Minute lang kräftig geschüttelt und anschließend in der Eppendorf-Zentrifuge (5412) abzentrifugiert (9980 x g, 5 min). 200 µl des klaren Überstandes wurden zum Messen der Radioaktivität eingesetzt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde zugrunde gelegt, daß bei vollständiger Umsetzung von 0,09 µMol ³H-Tryptamin 15170 cpm gemessen werden.

7.2.3. Spezifische Glucosidase

Die spezifische Glucosidase verwendet als Substrat Strictosidin. Die Aktivität des Enzyms wurde mit folgendem Ansatz bestimmt: 5 μ Mol Kaliumphosphat-Puffer (0,2 M, pH 6.3), 300 pMol 3-³H-Strictosidin und 20 - 500 ng Protein in einem Gesamtvolumen von 50 μ l wurden in 2,2 ml Eppendorfgefäßen 30 Minuten bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Gefäße in ein Eisbad und Zugabe von 0,5 ml eiskaltem Kaliumphosphat-Puffer (1 M, pH 7.0) unterbrochen. Nach Zugabe von 0,5 ml Extraktionslösung (Benzol-n-Hexan, 3:1) wurden die Ansätze 45 Minuten auf einem Überkopfschüttler (Reax II, Firma Heidolph) bei 34 rpm extrahiert. 0,2 ml der organischen Phase wurden anschließend zum Messen der Radioaktivität des enthaltenen Strictosidin-Aglykons verwendet. Ein kat Strictosidinglucosidase entsprach der Enzymmenge, die 1 Mol Strictosidin pro Sekunde bei 30° C, pH 6.3 und einer Substratkonzentration von 6 μ M durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung spaltet (HEMSCHIEDT, 1979).

7.2.4. Unspezifische Glucosidase

Der unspezifische Glucosidase diente o-Nitrophenyl- β -D-Glucosid als Substrat. Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität setzte sich folgendermaßen zusammen: 20 μ Mol Kaliumphosphat-Puffer (0,2 M, pH 6.3), 2,5 μ Mol o-Nitrophenyl- β -D-Glucosid (Firma Sigma, München) und 16 - 400 μ g Protein in einem Gesamtvolumen von 250 μ l. Die Ansätze wurden bei 30° C 14 - 24 Stunden inkubiert, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,75 ml bzw. 2,75 ml Natriumcarbonatlösung (1 M) unterbrochen. Die Extinktion wurde bei 400 nm gegen einen Blindwert (ohne

Protein bzw. ohne o-Nitrophenyl- β -D-Glucosid) gemessen. Für die Berechnung der Menge des freigesetzten o-Nitrophenols wurde der bekannte Extinktionskoeffizient $\epsilon = 18,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ zugrunde gelegt. Ein kat o-Nitrophenyl- β -D-Glucosid-Glucosidase entsprach der Enzymmenge die 1 Mol des Substrates pro Sekunde bei 30°C , pH 6.3 und einer Substratkonzentration von 4,5 mM in o-Nitrophenol und Glucose spaltet (HEMSCHIEDT, 1979).

7.2.5. Saure Phosphatase

Der Test zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase wurde wie folgt angesetzt: zu 50 μMol Citrat-Puffer (0,05 M, pH 4,8) mit 5,5 μMol p-Nitrophenylphosphat (Serva, Heidelberg) wurden 5 - 15 μg Protein zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10 ml 0,02 N Natronlauge zugesetzt, die Reaktion wurde dadurch unterbrochen und das freigesetzte p-Nitrophenol in das gelbe Anion überführt. Die Extinktion der Proben wurde bei 405 nm gegen einen Blindwert gemessen, bei dem das Protein erst nach Zugabe der Natronlauge zugeführt worden war. Da die Phosphataseaktivität der pro Zeiteinheit freigesetzten Menge an p-Nitrophenol direkt proportional ist, konnte mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol $\epsilon = 18,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ die Enzymaktivität berechnet werden. Ein kat saure Phosphatase entsprach dabei der Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde bei 37°C und einer Substratkonzentration von 5,5 mM in o-Nitrophenol und Phosphat spaltet (BERGMEYER, 1962).

7.3. Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen wurden mit der modifizierten Lowry-Menge nach BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) durchgeführt.

3 ml Enzymlösung (50 - 100 µl Rohextrakt) wurden mit 50 µl 1 %igem wäßrigem Desoxycholat 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 24 %iger Trichlor-essigsäure wurden die enthaltenen Proteine gefällt und anschließend 30 Minuten bei 3600 x g in einer Christ-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment nach Zugabe von 1 ml Aqua dest. in 1 ml alkalischem Kupferreagenz gelöst. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:10 verdünnt) zugefügt und weitere 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 540 nm im Hitachi-Spectrophotometer bestimmt und der Proteingehalt an Hand einer zuvor mit Rinderserumalbumin aufgenommenen Eichgeraden errechnet.

8. Applizierte Substanzen

Es wurde die Wirkung folgender Substanzen auf die Stoffwechselleistungen der verwendeten Zellkulturen untersucht: Tryptamin und Digitoxin stammten von der Firma Carl Roth, Karlsruhe; Secologanin wurde von Boehringer, Mannheim, geliefert und L-Tryptophan stammte von Merck, Darmstadt.

Die verwendeten Phenoxyessigsäuren waren von Frau Dr. U. SCHULTE (1978) synthetisiert worden oder stammten von Amchem Products Inc. Ambler/Pennsylvania (USA). Weitere Verbindungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. E. Ebert, Ciba-Geigy zur Verfügung gestellt.

Das zum Erkennen von Regulationsmutanten verwendete 5-Methyl DL-Tryptophan wurde durch Sigma Chemical Company, St. Louis, MO (USA) bezogen.

Alle applizierten Substanzen, mit Ausnahme von Digitoxin waren hitzestabil und konnten dem Kulturmedium in der gewünschten Konzentration vor dem Autoklavieren zugesetzt werden. Digitoxin wurde als alkoholische Lösung (0,5 mg/0,5 ml 96 % Äthanol) unter sterilen Bedingungen zu 25 ml autoklaviertem Medium hinzupipettiert.

9. Radiochemikalien

2-³H-Tryptamin wurde von Fräulein U. Seipel und Herrn Dr. J. Treimer, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität, synthetisiert. ³H-Vindolin (14 mCi/μMol), ³H-Ajmalin (7,5 mCi/μMol) und ³H-Catharanthin (14,5 mCi/μMol) stammten aus Kundensynthesen von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig. G-³H-Tryptamin (1 mCi/μMol) wurde vom Radiochemical Centre, Amersham (GB) bezogen. ³H-Ajmalicin (10 mCi/μMol), ³H-Serpentin (0,66 mCi/μMol), ³H-Scopolamin (0,67 mCi/μMol) und ³H-Nikotin (2,5 mCi/μMol) waren von Herrn Doz. Dr. J. Stöckigt hergestellt worden. (2-¹⁴C)-Tryptamin wurde von NEN (Boston, MA, USA) bezogen. ³H/¹⁴C-Strictosidin (39 Ci/μMol ³H/7,14 Ci/μMol ¹⁴C) und 3-³H-Strictosidin (34 Ci/μMol) waren nach der von NAGAKURA et al. (1979) beschriebenen Methode am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie synthetisiert worden.

10. Radioaktivitätsmessung

Zur Radioaktivitätsbestimmung durch Flüssigkeitsszintillation wurde der Szintillationszähler Betaszint BF 500 verwendet. Als Szintillator dienten je 5 ml Quickszint 212 der Firma Koch-Light Laboratories Ltd.. Zum Messen der Radioaktivität auf Dünnschichtplatten wurde der Dünnschichtscanner II LB 2722 kombiniert mit dem Schreiber der Firma Berthold, Wildbad, eingesetzt.

11. Immobilisierung von Pflanzenzellen

11.1. Einschlußmethode

Zur Immobilisierung wurde die Alginatmethode eingesetzt. Alginat wurde als Natriumsalz Typ IV von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) geliefert. Es wurde eine 3 %-ige Alginatlösung verwendet, die folgendermaßen ange-setzt wurde: Die zu verwendende Alginatmenge wurde in entsprechender Menge Aqua dest. durch Erhitzen unter Rühren gelöst. Um eine vollständig homogene Lösung zu erhalten, wurde sie anschließend in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben 15 Minuten autoklaviert. Dabei wurde die Lösung gleichzeitig sterilisiert und konnte so auch zur Immobilisierung unter sterilen Bedingungen eingesetzt werden. 25 ml dieser Alginatlösung wurden mit 15 g vom Kulturmedium abfiltrierten Zellen unter Zugabe von 5 ml Medium vorsichtig vermischt. Das Gemisch wurde in eine 10 ml Plastik-Einwegspritze (Pharma-Plast, Typ A) mit zugehöriger Nadel ("Super-Hone", Nr. 1,0, 90 x 40 mm) gefüllt. Unter leichtem Druck wurde das Alginat-Zellgemisch aus der Spritze in 60 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung eingetropft. Die CaCl_2 -Lösung wurde dabei in einem Becher-

glas auf dem Magnetrührer leicht gerührt. Die Spritze sollte etwa 15 cm hoch über der Lösung gehalten werden, damit sich die sich von der Nadel lösenden Tropfen während des Fallens abrunden konnten. Beim Eintauchen in die CaCl_2 -Lösung bildeten sich durch Polymerisation des Alginates gleichmäßig geformte Kugeln von durchschnittlich 3,5 mm Durchmesser. Für den anschließenden Reifungsprozeß, bei dem die Kugeln aushärteten und dabei etwas schrumpften, wurden die Polymerisate für ca. 4 Stunden in der CaCl_2 -Lösung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden sie mit Kulturmedium mehrmals gewaschen und konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden (BRODELIUS et al., 1979).

Durch Phosphat-Puffer oder Medium mit hohen Phosphatkonzentrationen ließen sich die in den Kugeln eingeschlossenen Zellen durch Lösen des Alginat-Polymerisates aufgrund der Bildung von Calciumphosphaten wieder freisetzen.

11.2 Kultivierung immobilisierter Zellen

Für die Kultivierung der eingeschlossenen Zellen wurden 30 Kugeln unter sterilen Bedingungen in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml des entsprechenden Mediums übertragen. Die Kolben wurden bei 100 rpm auf einem Rotationsschüttler bei 23° C Dauerlicht und 70 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

11.3 Kontinuierliche Alkaloidbildung im Säulenverfahren

Zur kontinuierlichen Biosynthese von Indolalkaloiden aus applizierten Vorstufen, wurden 250 - 300 Kugeln mit immobilisierten Zellen in eine Säule geschichtet. Als

Säule wurde eine 10 ml Einwegspritze (ohne Nadel) verwendet, die durch einen Gummistopfen fest verschlossen wurde. Durch Silikonschlauchverbindungen war die Säule mit einem Vorratsgefäß verbunden, das als untere Phase Chloroform (10 ml) und als darübergeschichtete wäßrige Phase Kulturmedium (15 ml) enthielt. Mit Hilfe einer LKB 2115 Multiperpex-Pumpe wurde das Medium aus dem Vorratsgefäß von unten durch das Säulenbett gepumpt (Flußrate: 20 ml/h) und von der Säule kommend in die Chloroformphase des Vorratsgefäßes geleitet. Dadurch wurde das Eluat der Säule kontinuierlich beim Durchperlen des Chloroforms extrahiert. Nach 12stündiger Vorlaufzeit wurden die Vorstufen zum Medium zugegeben und über einen Zeitraum von 90 Stunden die Bildung von radioaktiv markierten, chloroformextrahierbaren Substanzen gemessen. Dafür wurden je 100 µl der Chloroformphase in 5 ml Quickszint gegeben und im Szintillationszähler gemessen. Weitere 100 µl wurden auf Dünnschichtplatten aufgetragen, in den Laufmitteln (V) und (VIII) entwickelt. Die Alkaloidflecken wurden ausgeschnitten und nach Zugabe von 5 ml Quickszint ausgezählt.

12. Protoplastenisolierung

Die Protoplastenisolierung wurde nach der von SCHIEDER (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. Da die isolierten Protoplasten nur zu Kurzzeitversuchen, nicht zur Kultivierung, verwendet wurden, konnte die Aufarbeitung unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden.

12.1. Enzymlösungen und Reinigungsmethode

Die zur Protoplastenbereitung verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Meicellase, Onozuka SS und Macerozyme von All Japan Biochemicals Co. Ltd. sind erhältlich über die Firma Welding & Co., Hamburg. Pectinol D (fest) stammte von Erbslöh & Co., Geisenheim und wurde über die Firma Röhm GmbH, Darmstadt geliefert. Cellulysin wurde von Calbiochem (Los Angeles, USA) und Driselase von Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. geliefert. Die für die Aufarbeitung verschiedener Gewebe notwendigen Enzymlösungen wurden durch Kombination dieser Enzyme und einem geeigneten Osmotikum zusammengesetzt.

Enzymlösung A: 3,0 % Meicellase
 1,5 % Macerozyme
 0,5 M Mannit

pH 5.8, Inkubationszeit: 4-6 h bei 30° C
und 100 rpm

Enzymlösung B: 4,5-5 % Meicellase
 2-3 % Pectinol D
 in einem Gemisch aus gleichen
 Teilen 0,5 M Mannit und 0,2 M
 CaCl₂

pH 5.8, Inkubationszeit: 5-7 h bei 30° C
und 100 rpm

Enzymlösung C: 4,0 % Cellulysin
 2,0 % Macerozyme
 0,4 M Mannit

pH 6.0, Inkubationszeit: 4-5 h bei 30° C
und 100 rpm

Enzymlösung D:

0,4 % Onozuka SS

0,3 % Driselase

0,2 % Macerozyme

0,4 M Mannit

pH 5.6, Inkubationszeit: 6 h bei 30° C
ohne Schütteln

10 cm³ vom Medium abfiltrierte Zellen wurden in 100 ml Enzymlösung inkubiert. Nach dem Freisetzen der Protoplasten wurde die Suspension über ein Nylonnetz (Monodur, 100 µl) filtriert und mit 80 %igem Seewasser (Nordseewasser von List/Sylt) 1:1 verdünnt. Danach wurden die Protoplasten in der Hettich-Tischzentrifuge (Universal II, Rotor mit ausschwenkbarem Röhrcheneinsatz) bei 90 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit noch enthaltenen Verunreinigungen wurde verworfen, das Protoplastensediment durch Zugabe von Seewasser aufgewirbelt und erneut abzentrifugiert. Die Protoplasten wurden dreimal mit Seewasser gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in einem bekannten Volumen des Inkubationsmediums aufgenommen. Der Protoplastentiter der Suspension wurde unter dem Mikroskop in einem Haemocytometer bestimmt (vgl. 5.1.).

12.2. Inkubationsmedium und Inkubationsbedingungen

Zur Untersuchung der Substanzaufnahme von isolierten Protoplasten wurden die Protoplasten in einer nach DOLL et al., (1979) abgewandelten Inkubationslösung folgender Zusammensetzung inkubiert:

10 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7.6

1 mM EDTA

0,5 M Mannit

HEPES (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure) wurde von der Firma Serva, Heidelberg bezogen. EDTA Titriplex III (Äthylendinitrilotetraessigsäure) stammte von Merck, Darmstadt.

Proben der Protoplastensuspension (1 ml) wurden in 35 mm Plastikpetrischalen (Corning) zu den zu testenden Substanzen inkubiert. Dabei wurde durch Schrägstellen der Petrischalen erreicht, daß sich die Suspension als Tropfen an einer Seite der Schale konzentrierte. Die Inkubation wurde 60 - 120 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und danach durch Filtrationszentrifugation (s. 13.3.) beendet.

13. Vakuolenisolierung

Für die Isolierung von Vakuolen aus Protoplasten verschiedener Gewebe wurde die von GROB und MATILE (1979) beschriebene Methode leicht abgewandelt. Das für die Herstellung der Dichtegradienten zur Reinigung der Vakuolen verwendete Urografin ist ein Gemisch aus dem Natrium- und dem Methylglukaminsalz der N,N-Diacetyl-3,5-diamino-2,4,6-trijodbenzoesäure und wird als Röntgenkontrastmittel für die Urographie eingesetzt. Urografin wurde von der Schering AG, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Firma sei an dieser Stelle herzlich für die großzügige Hilfe gedankt.

13.1. Aufschluß- und Reinigungsverfahren

Zum Freisetzen der Vakuolen wurden die zuvor isolierten Protoplasten sedimentiert und zu etwa 2 cm³ Protoplasten 20 ml Lysiermedium zugegeben. Das Lysiermedium setzte

sich aus Tris-HCL-Puffer (50 mM, pH 7.6), EDTA (5 mM) und Natriumchlorid (0,5 M) zusammen. Durch die im Lysiermedium herrschenden osmotischen Bedingungen wurde das Plasmalemma zerstört und die Vakuolen freigesetzt. Der Tonoplast war gegenüber der osmotischen Beanspruchung stabil, so daß die freigesetzten Vakuolen sogar mehrere Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten. Das hier verwendete Lysiermedium wurde denen von anderen Autoren beschriebenen (BOLLER und KENDE, 1979; SAUNDERS, 1979; SASSE et al., 1979) vorgezogen, da die freigesetzten Vakuolen keine am Tonoplasten anhaftenden Cytoplasmareste mehr aufwiesen. Durch vorsichtiges Pipettieren der Suspension wurde das Lysieren der Protoplasten mechanisch unterstützt. Nach 15 - 30 Minuten konnte die Vakuolensuspension zum Reinigen auf die Dichtegradienten übertragen werden. Die Zentrifugation erfolgte in zwei Schritten. Für den ersten Gradienten wurden 7,5 ml der Urografinlösung 1 (0,7 M NaCl + 25 % Urografin [2:3]) mit 7,5 ml Urografinlösung 2 (0,7 M NaCl + 25 % Urografin [7:1]) überschichtet, darauf 15 ml der Vakuolensuspension gegeben und anschließend 15 Minuten bei 500 x g in der Hettich-Tischzentrifuge (mit ausschwingbarem Röhreneinsatz) zentrifugiert. Dabei sammelten sich die Cytoplasma- und Plasmalemmareste als Sediment an, die Vakuolen waren als klare Bande im unteren Drittel des Gradienten zu erkennen. Mit einer Pasteurpipette wurden die Vakuolen in ein frisches Zentrifugenglas übertragen, mit 25 %igem Urografin 1:1 gemischt und zuerst mit 7,5 ml Urografinlösung 3 (0,7 M NaCl + 25 % Urografin [3:7]) und dann mit 5-ml 0,7 M NaCl-Lösung überschichtet. Bei der sich anschließenden Zentrifugation (650 x g, 10 min) sammelten sich die gereinigten Vakuolen in der NaCl-Schicht und konnten mit einer 200 µl-Eppendorf-Pipette vom Gradienten abgenommen werden. Zum Bestimmen des Vakuolentiters wurden Proben der Vakuolensuspension unter dem Mikroskop ausgezählt (vgl. 5.1).

13.2. Inkubationsmedium und Inkubationsbedingungen

Der Standardansatz für die Inkubation von Vakuolen mit verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen setzte sich zusammen aus 0,7 M NaCl, 40 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,6, 4 mM EDTA, 4 mM $MgCl_2$ und 4 mM ATP. Alle enthaltenen Substanzen, außer dem Osmotikum NaCl, waren vierfach konzentriert angesetzt, und wurden durch Zugabe der Vakuolensuspension (0,75 ml zu 0,25 ml Inkubationsmedium) auf die optimale Konzentration verdünnt. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen, die für die Protoplasten bereits beschrieben worden sind.

13.3. Filtrationszentrifugation

Nach erfolgter Inkubation mit radioaktiv markierten Alkaloiden mußten die Vakuolen zum Messen der aufgenommenen Substanzen vom Medium getrennt werden. Dafür wurde die von HELDT und SAUER (1971) an Chloroplasten angewendete Methode der Filtrationszentrifugation eingesetzt. Es wurden 100 μ l Siliconöl AP 150 (Wacker-Chemie, Burghausen) in ein spezielles Plastik-Zentrifugenröhrchen (250 μ l) pipettiert und darauf 100 μ l des Inkubationsansatzes gegeben. Die Röhrchen wurden in die Halterungen einer Beckman Microfuge B eingesetzt und 1 Minute bei ca. 8000 x g zentrifugiert. Dabei sammelten sich die Vakuolen im Siliconöl an der Spitze des Röhrchens an und wurden so vom wäßrigen Überstand getrennt. Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen mit flüssigem Stickstoff eingefroren, die Spitze mit den enthaltenden Vakuolen mit einem scharfen Messer abgeschnitten und in ein Szintillationsglas mit 5 ml Quickszint gegeben. Die von den Vakuolen aufgenommene Radioaktivität konnte danach gemessen werden. Protoplasten, die mit markierten Alkaloiden inku-

biert worden waren, wurden in gleicher Weise behandelt, nur war zur Filtrationszentrifugation in diesem Fall das Siliconöl AR 200 nötig. Eine Probe dieser Siliconöle war freundlicherweise von der Firma Wacker-Chemie, Burghausen, übersandt worden.

Zur Kontrolle wurden Protoplasten und Vakuolen durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff zerstört. Nach dem Auftauen wurden 1 ml Proben dieser Suspensionen mit den zu testenden Substanzen den intakten Protoplasten und Vakuolen entsprechend inkubiert und abzentrifugiert. Die in diesen Sedimenten gemessene Radioaktivität wurde von den Meßwerten der Sedimente intakter Protoplasten und Vakuolen abgezogen.

III. ERGEBNISSE

1. Variationen des Alkaloidgehaltes innerhalb einer Zellpopulation

Plattiert man Zellen einer homogenen Suspensionskultur und läßt sie zu Kolonien heranwachsen, so können schon makroskopisch Unterschiede festgestellt werden. Farbunterschiede deuten wiederum auf einen unterschiedlichen Sekundärstoffgehalt hin und verdeutlichen, daß auch Zellen einer Population zu sehr verschiedenen Stoffwechselleistungen fähig sein können. Catharanthus roseus Zellsuspensionen, die in dem für die Indolalkaloidbildung optimierten Medium (ZENK et al., 1977) wachsen, haben eine leicht hellgelbe Färbung. Ein Farbunterschied tritt bei diesem Gewebe nicht so deutlich in Erscheinung, wie es zum Beispiel bei anthocyanhaltigen Zellen von Daucus carota (STÄRK et al., 1976) der Fall war. Trotzdem findet man unter den herangewachsenen Kolonien solche, die sich durch intensivere Färbung von den anderen Kolonien unterscheiden (Abbildung 1). Bei anschließender Untersuchung von Kallus- und Suspensionskulturen, die sich aus weißen und intensiv gelb gefärbten Kolonien entwickelt hatten, zeigte sich, daß dieses Kriterium zur Selektion von Hochleistungsstämmen noch nicht genügt hatte. Weiße Kalluskulturen enthielten durchschnittlich weniger Indolalkaloide als intensiv gelb gefärbte, aber bei den daraus angelegten Suspensionskulturen bestand kein Zusammenhang mehr zwischen der Färbung des Kallus und der Alkaloidbildung der davon abgeleiteten Suspensionskultur (DEUS 1977). Die beobachtete Gelbfärbung ist sehr wahrscheinlich auf flavonoide Pigmente zurückzuführen.

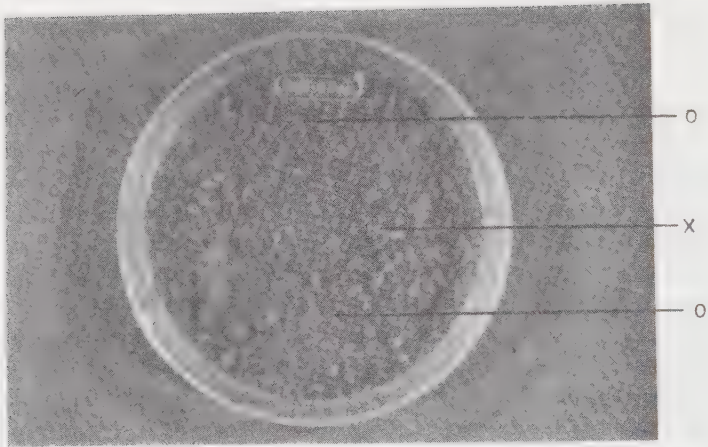


Abb. 1: Zellkolonien, die nach dem Plattieren von Zellen einer homogenen Suspensionskultur von *Catharanthus roseus* herangewachsen waren. O → intensiv gelb gefärbte Zellkolonien, X → wenig pigmentierte Zellkolonien.

Welche Schwankungen der Alkaloidgehalte innerhalb einer Zellpopulation auftreten können, konnte erstmals mit Hilfe des Radioimmunoassays an plattierten Zellen von *Catharanthus roseus* nachgewiesen werden (ZENK et al., 1977). Der Alkaloidgehalt von 160 getesteten Kolonien variierte von 0 - 1,4 % für Serpentin und von 0 - 0,8 % für Ajmalicin.

Wird die Fähigkeit zur Synthese von Inhaltsstoffen bei der Zellteilung nach genetischen Gesetzmäßigkeiten auf die Tochterzellen verteilt, so müßten Zellen einer Population mit exakt der gleichen genetischen Information ausgerüstet sein. Die aus ihnen herangewachsenen Kolonien sollten daher auch gleiche Kapazität zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe haben. Die an Zellkolonien

von Catharanthus roseus festgestellten großen Unterschiede im Serpentin- und Ajmalicingehalt können daher nicht nur auf die genetische Variationsbreite zurückgeführt werden, sondern zeigen eventuell ein epigenetisches Phänomen an. Epigenetische (extrachromosomale) Vererbung ist auf Erbinformation zurückzuführen, die nicht in den Chromosomen des Zellkerns, sondern z.B. in Plastiden oder Mitochondrien lokalisiert ist (vgl. GLEBA, 1978). Bei der Mitose werden diese extrachromosomalen Gene nicht gesetzmäßig und gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Diese Zellen könnten sich daher auch erheblich in ihren biochemischen Fähigkeiten unterscheiden. Weiterhin könnten die Variationen im Alkaloidgehalt einer Zellpopulation darauf zurückzuführen sein, daß eine für die Biosynthese notwendige Vorstufe in unterschiedlichem Maße gebildet wird. Zudem könnten die Aktivitäten der Enzyme, die für die Bildung der Inhaltsstoffe verantwortlich sind, variieren und sich so auf die Produktbildung der Zellkolonien auswirken. Daher wäre es interessant, an einer Population von Zellkolonien nicht nur den Gehalt der Inhaltsstoffe, sondern auch den ihrer Vorstufen und die Aktivität der Enzyme ihre Biosynthesewegs zu untersuchen, um dadurch eventuell Hinweise auf die Ursachen unterschiedlicher Produktionsfähigkeiten zu bekommen.

1.1. Untersuchungen an Zellkolonien

An Zellkolonien von Catharanthus roseus, die von einer Suspensionskultur mit durchschnittlichem Alkaloidgehalt (Serpentin und Ajmalicin $\approx 0,2$ % des Trockengewichtes) stammten, wurde daraufhin untersucht, ob die Fähigkeit zur Bildung der Inhaltsstoffe (Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) mit der Menge an zur Verfügung stehender Vorstufe (Secologanin) und der Enzymaktivität

der Strictosidin-Synthase korreliert ist. Die Strictosidin-Synthase katalysiert den ersten Schritt der Indolalkaloidbiosynthese, die Kondensation von Tryptamin und Secologanin, sie kann daher als Schlüsselenzym für das weite Spektrum der Indolalkaloide angesehen werden. Durch Erarbeitung einer speziellen Aufschlußmethode war es möglich gewesen, die Strictosidin-Synthase Aktivität auch in kleinen Gewebemengen exakt bestimmen zu können (SEIPEL, 1979). In Zusammenarbeit mit Fräulein Seipel wurden 50 willkürlich gewählte Kolonien einer Zellpopulation von Catharanthus roseus untersucht. Die Zellen waren in dem für die Indolalkaloidbildung optimierten Produktionsmedium (ZENK et al., 1977) plattiert worden und nach fünfwöchiger Kultivierung zu Kolonien von durchschnittlich 2 mm Durchmesser herangewachsen. Unter sterilen Bedingungen wurde jede Kolonie in vier gleiche Teile geteilt. Je ein Sektor wurde zur Subkultivierung in die Kammern einer Mikrotiterplatte übertragen, ein Teil wurde zur Analyse der Inhaltsstoffe extrahiert, der dritte Teil wurde für den Enzymtest aufgeschlossen und von dem letzten Viertel wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt. Das durchschnittliche Trockengewicht eines Sektors betrug 0,76 mg.

Die Untersuchung der Alkaloidgehalte mit dem Radioimmunoassay ergab auch in diesem Fall eine breite Streuung zwischen 0 % und 1,0 % (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin). Die Kolonie mit dem höchsten Gehalt von 1 % übertraf also den Gehalt der Ausgangskultur um das 5fache. Die Gehalte der biogenetischen Indolalkaloidvorstufen Loganin/Secologanin variierten in einem noch viel größeren Bereich zwischen 0 % und 4 % des Trockengewichtes. Diese Variationen spiegeln sich auch deutlich in der spezifischen Aktivität der Strictosidin-Synthase wieder. Der niedrigste gemessene Wert betrug 3,3 pkat

pro mg Trockengewicht, die Kolonie mit maximaler Enzymaktivität (22,7 pkat/mg Trockengewicht) erreichte dagegen annähernd den 7fachen Wert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Korrelationen zwischen dem Loganin/Secologaningehalt, den enthaltenen Alkaloiden und der Aktivität der Strictosidin-Synthase in Zellkolonien von Catharanthus roseus. Eine deutliche Beziehung besteht zwischen dem Gehalt der Vorstufe und dem der daraus gebildeten Alkaloide. Kolonien, die einen vergleichsweise geringen Loganin/Secologaningehalt aufwiesen, hatten auch wenig oder gar keine Alkaloide gebildet. Die überdurchschnittlich hohe Alkaloidbildung anderer Kolonien war offensichtlich auf ein hohes Angebot an der Vorstufe Secologanin zurückzuführen, denn ihre Gehalte an Loganin/Secologanin lagen weit über dem Durchschnitt. Beim Vergleich mit den Enzymaktivitäten war die Beziehung nicht so ausgeprägt. Hohe Enzymaktivitäten traten auch bei Kolonien mit hohem Alkaloidgehalt auf, aber bei Kolonien mit mittlerem und niedrigem Gehalt konnten keine deutlichen Unterschiede der Enzymaktivitäten festgestellt werden. Auffallend waren fünf Kolonien mit sehr hohem Gehalt an Loganin/Secologanin, die aber nur durchschnittliche Alkaloidgehalte und Enzymaktivitäten aufwiesen. Der Gehalt an Loganin/Secologanin wurde ebenfalls mit einem Radioimmunistest bestimmt. Es wurde dabei nicht allein Secologanin gemessen, sondern auch durch Kreuzreaktion mit dem enthaltenen Loganin der Loganingehalt mit erfaßt. Es ist daher möglich, daß Zellkolonien, bei denen ein hoher Loganin/Secologaningehalt festgestellt wurde, überwiegend Loganin enthielten. Loganin selbst kann aber von den Enzymen der Indolalkaloidsynthese nicht als Substrat erfaßt werden (TREIMER und ZENK, 1978), so daß den Zellen dieser Kolonien nur der geringe Anteil an Secologanin zur Verfügung stand und die Produktbildung als Folge davon niedrig war.

Tabelle 1: Loganin/Secologanin-, Alkaloidgehalte und spezifische Aktivitäten des Enzyms Strictosidin-Synthase in Zellkolonien von Catharanthus roseus.

Stamm	Loganin/ Secologanin % TG	Serpentin % TG	Ajmalicin % TG	Tetrahydro- alstonin % TG	Cesant- alkaloid % TG	pkat Enzym/ mg TG
4	0.15	0	0	0.02	0.02	9.0
16	0.38	0	0.01	0	0.01	7.8
21	0.23	0	0	0	0	4.9
23	0.58	0.02	0.06	0	0.08	5.2
43	0.68	0	0.04	0	0.04	5.9
18	1.11	0.13	0.06	0.01	0.20	8.4
20	0.08	0	0	0.05	0.05	7.8
32	1.57	0	0.07	0.07	0.14	13.9
36	2.33	0.08	0.05	0.03	0.16	11.2
38	1.19	0.10	0.07	0.03	0.20	7.9
6	1.75	0.49	0.07	0.01	0.57	16.8
10	2.97	0.09	0.79	0.13	1.01	21.8
11	3.03	0.39	0.10	0.01	0.50	22.7
24	4.17	0.17	0.62	0.02	0.81	26.6
30	1.04	0.51	0.43	0.06	1.00	22.5
2	2.04	0	0.07	0.01	0.08	15.5
17	4.00	0.21	0.16	0.02	0.39	9.9
28	3.39	0.11	0.08	0.02	0.21	10.4
33	3.17	0.10	0.14	0.08	0.32	19.4
40	2.82	0.14	0.12	0.04	0.30	8.6

Die Fähigkeit zur Synthese von Inhaltsstoffen ist also sogar bei Zellen einer Population unterschiedlich stark ausgeprägt und hängt offensichtlich mit der Bereitstellung von Vorstufen zusammen. Durch Selektion von Kolonien bietet sich hier die Möglichkeit, bereits aus einer Zellpopulation Zellstämme mit besonders unterschiedlichen biochemischen Leistungen, sei es für die Bildung von Vorstufen oder die der Endprodukte, zu gewinnen.

1.2. Alkaloidbildung varianter Zellstämme gleicher Abstammung

Anschließende Untersuchungen sollten klären, wie sich die auf der Ebene der einzelnen Zellkolonien aufgetretenen Variationen der Alkaloidgehalte in den Gehalten der etablierten Zellstämme ausdrücken. Dafür wurden Zellen eines Stammes von Catharanthus roseus plattiert und die herangewachsenen Kolonien auf Agarmedium übertragen. Die sich daraus entwickelnden Kallusstämme wurden über mindestens 10 Passagen kultiviert. Danach wurden Zellen jedes Stammes auf Produktionsmedium übertragen und nach 4wöchiger Kultivierung der Alkaloidgehalt des Kallusgewebes ermittelt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Verteilung der Alkaloidgehalte von 40 Zellstämmen, die sich ursprünglich alle von einem Zellstamm ableiteten. Auch nach mehreren Passagen trat eine erhebliche Variation im Alkaloidgehalt auf. So hatte Stamm S mit 2,7 % Gesamtalkaloidgehalt (Summe aus Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) 270mal mehr dieser Alkaloide gebildet als Stamm Y mit 0,01 %igem Gehalt. Etwa ein Drittel der hier untersuchten Stämme wiesen einen mehr als 1,0 %igen Gesamtalkaloidgehalt auf. Vergleicht man den Anteil

Tabelle 2: Die Alkaloidbildung varianter Zellstämme von
Catharanthus roseus

Stamm	Serpentin % TG	Ajmalicin % TG	Tetrahydro- alstonin % TG	Gesamtalkaloid gehalt % TG
A	0.44	0.11	0	0.55
B	0.60	0.07	0	0.67
C	0.17	0.47	0.03	0.67
D	0.17	0.66	0.02	0.85
E	1.37	0.11	0.03	1.51
F	1.43	0.20	0.01	1.64
G	0.22	0.16	0.10	0.48
H	0.06	0.06	0.19	0.31
I	0.35	0.25	0.05	0.65
K	1.28	0.11	0.13	1.62
L	0.15	0.02	0.12	0.29
M	0.16	0.28	0.03	0.47
N	0.40	0.96	0.33	1.69
O	0.11	0.16	0.02	0.29
P	0.01	0.03	0.03	0.07
Q	0.56	1.09	0.19	1.84
R	0.11	0	0	0.11

Tabelle 2, Fortsetzung

Stamm	Serpentin	Ajmalicin	Tetrahydro- alstonin	Gesamtalkaloid- gehalt
	% TG	% TG	% TG	% TG
T	0.36	1.82	0.25	2.43
U	0.39	0.34	0.21	0.94
V	0.05	0.34	0	0.39
W	0.47	0.25	0.03	0.78
X	0.77	0.05	0.02	0.84
Y	0.01	0	0	0.01
Z	0.22	0.24	0.09	0.55
a	0.09	0.31	0.10	0.41
b	0.31	0.13	0.01	0.46
c	0.37	1.13	0.45	1.95
d	0.20	0.81	0.19	1.20
e	0.56	0.47	0.16	1.18
f	0.20	0.14	0.14	0.48
g	0.15	0.02	0.09	0.26
h	0.09	0.13	0.30	0.52
i	0.35	0.25	0.05	0.65

Tabelle 2, Fortsetzung

Stamm	Serpentin % TG	Ajmalicin % TG	Tetrahydro- alstonin % TG	Gesamtalkaloid- gehalt % TG
k	0.28	0.31	0.12	0.71
l	0.46	0.13	0.07	0.66
m	0.52	0.52	0.06	1.08
n	0.48	0.16	0.05	0.69
o	0.58	0.42	0.05	1.05
p	0.41	0.33	0.03	0.77

der einzelnen Alkaloide am Gesamtalkaloidgehalt der verschiedenen Zellstämme, so findet man, daß Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin nicht mit einem konstanten Verhältnis zueinander gebildet werden. Einige Stämme enthalten überwiegend Serpentin (E, F, K, X) andere überwiegend Ajmalicin (D, Q, T, c) und wieder andere bilden hauptsächlich Tetrahydroalstonin (H, h). Annähernd gleiche Akkumulation aller drei Alkaloide konnte bei den Stämmen P und U festgestellt werden, während bei den Stämmen R und Y nur eines der drei untersuchten Alkaloide, nämlich Serpentin, nachgewiesen werden konnte. Diese Variationen verdeutlichen, welches unterschiedliche Potential an biochemischer Leistungsfähigkeit einem Zellstamm zu eigen ist, da sich alle diese varianten Stämme ursprünglich von der gleichen Suspensionskultur eines Stammes von Catharanthus roseus ableiteten. Neben der Selektion von Hochleistungstämmen, die sich durch optimale Produktion aller drei Alkaloide auszeichnen, ist es ebenso möglich, gezielt diejenigen Stämme zu isolieren, die nur eines der Alkaloide aus dem enthaltenen Muster an Inhaltsstoffen vermehrt produzieren bzw. solche, die fast alkaloidfrei sind (Stamm Y).

2. Selektion varianter Zellstämme mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Der Einsatz des Radioimmuntests als eine sehr spezifische Analysenmethode, die zudem einen hohen Probenumsatz ermöglicht, war ein großer Fortschritt für die Untersuchung der Sekundärstoffbildung innerhalb einer Zellpopulation, besonders wenn es sich dabei um nicht gefärbte Inhaltsstoffe handelte. Die Selektion von Kolonien mit gefärbten Inhaltsstoffen hat aber gegenüber dem Radio-

immunoassay den Vorteil, daß keinerlei Aufarbeitungs- oder Analysenschritte vor der Selektion notwendig sind, da der Beobachter sofort visuell entscheiden kann, welche der Kolonien einen hohen Gehalt aufweisen und so zur Subkultivierung geeignet sind. Wäre es möglich, mit einer geeigneten Technik auf den Gehalten an nicht gefärbten Inhaltsstoffen in der lebenden Zelle sichtbar zu machen, um so gut produzierende Zellen von denen mit geringer Produktion zu unterscheiden, und gelänge es dann weiterhin, diese Zellen zur Entwicklung und zur Bildung von Zellstämmen zu bringen, wäre das ein großer Vorteil für die Selektion von hochproduzierenden Zellstämmen auf der Ebene der Zellen selbst. Allerdings wäre es schwierig, die in den Zellen enthaltenen Substanzen durch Behandlung mit einem Farbstoff sichtbar zu machen. Der verwendete Farbstoff müßte, da die meisten Sekundärstoffe in der Vakuole lokalisiert sind, Zellwand, Plasmalemma und Tonoplast passieren können. Außerdem dürfte er die Zellen in keiner Weise schädigen, da ja diejenigen Zellen mit hohem Gehalt an Inhaltsstoffen zur Anlage von Zellstämmen weiterkultiviert werden sollen (ZENK, 1978 b). Sehr vielversprechend ist daher die Fluoreszenzmikroskopie, bei der durch Anregung mit einer energiereichen Strahlung geeigneter Wellenlänge ungefärbte Substanzen durch ihre spezifische Primärfluoreszenz in der lebenden Zelle sichtbar gemacht werden können, ohne dabei die Zelle selbst zu schädigen. Abbildung 2 zeigt Zellen von Catharanthus roseus, die nach Anregung mit UV-Licht intensiv hellblau fluoreszieren. Diese hellblaue Fluoreszenz wird durch das Alkaloid Serpentin und in geringerem Maße durch Ajmalicin verursacht. Offensichtlich variierte bereits der Alkaloidgehalt dieser drei Zellen einer Zellkette, da die Zellen unterschiedlich intensiv fluoreszierten.

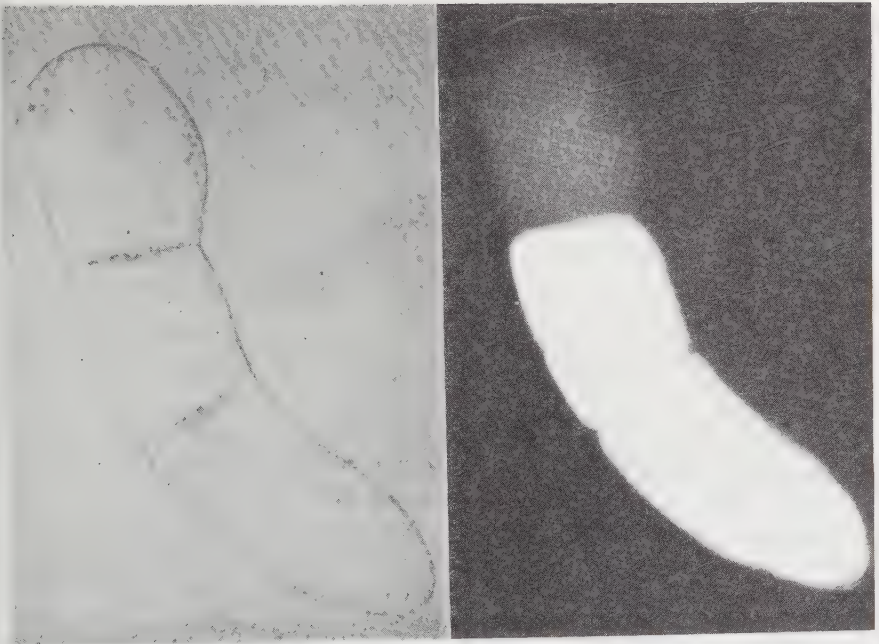


Abb. 2: Zellen von Catharanthus roseus im Hellfeld betrachtet (links) und Fluoreszenz dieser Zellen bei Fluoreszenzanregung mit UV-Licht (rechts). Die mittlere der drei Zellen, deren intensive Fluoreszenz auf einen hohen Alkaloidgehalt hinweist, macht eine Zellteilung durch.

Vergrößerung: 200fach

Durch Selektion von intensiv fluoreszierenden Zellkolonien von Catharanthus roseus waren 1977 erstmals Zellstämme isoliert worden, die besonders reich an Serpentin und Ajmalicin waren (DEUS, 1977). Durch Untersuchungen in größerem Maßstab sollte diese Selektionsmethode weiter erprobt und zur Anlage von Zellstämmen mit deutlich erhöhter Alkaloidproduktion eingesetzt werden.

2.1. Vergleich der Alkaloidgehalte mit dem fluoreszenzmikroskopischen Erscheinungsbild

Betrachtet man Proben einer Zellsuspension unter dem Fluoreszenzmikroskop so fällt auf, daß die enthaltenen Zellen, obwohl sie von einer homogenen Population abstammen, unterschiedlich intensiv fluoreszieren. Vergleicht man mehrere Stämme untereinander, findet man bei einigen anteilmäßig mehr intensiv fluoreszierende Zellen als bei anderen Stämmen, deren mikroskopisches Erscheinungsbild überwiegend von schwach oder gar nicht fluoreszierenden Zellen geprägt wird. Der Anteil an intensiv fluoreszierenden Zellen sollte demnach einen Hinweis auf die Alkaloidbildung des betreffenden Stammes geben. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde Gewebe aus Suspensionskulturen eines gut produzierenden Stammes von Catharanthus roseus (MT 70) und Gewebe eines wenig produzierenden Stammes (PU Pla 8bT) extrahiert und die Alkaloidgehalte der Extrakte chromatographisch und radioimmunologisch ermittelt. Parallel dazu wurden Proben dieser Suspensionen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung im UV-Bereich untersucht und die Zahl an intensiv und schwach bzw. nicht fluoreszierenden Zellen bestimmt. Pro Zellstamm wurden mehr als 1000 Zellen untersucht und der prozentuale Anteil der intensiv fluores-

zierenden Zellen mit dem durch Radioimmuntest ermittelten Alkaloidgehalt der Zellsuspensionen verglichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3 und Abbildung 3 wiedergegeben.

Stamm	PU Pla 8bT	MT 70
Serpentin (mg/l)	7.9	42.0
Ajmalicin (mg/l)	5.3	55.3
Tetrahydroalstonin (mg/l)	1.7	11.4
Gesamtalkaloidgehalt* (mg/l)	14.9	108.7
intensiv fluores- zierende Zellen (%)	6	84
schwach oder nicht fluoreszierende Zellen (%)	94	16
Anzahl der ausge- zählten Zellen	1183	1062

Tabelle 3: Vergleich der Alkaloidgehalte eines wenig Alkaloide bildenden (PU Pla 8bT) und eines gut produzierenden (MT 70) Stammes von Catharanthus roseus mit dem fluoreszenz-mikroskopischen Erscheinungsbild.

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin.

Der gut produzierende Stamm MT 70 hatte einen 7fach höheren Alkaloidgehalt (Summe aus Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) als der wenig Alkaloide bildende Stamm Pu Pla 8bT. Gleichzeitig war der prozentuale Anteil an intensiv fluoreszierenden Zellen bei dem gut produzierenden Stamm mit 84 % deutlich höher als bei dem wenig Alkaloid bildenden Stamm, bei dem nur 6 % der untersuchten Zellen intensiv fluoreszierten.

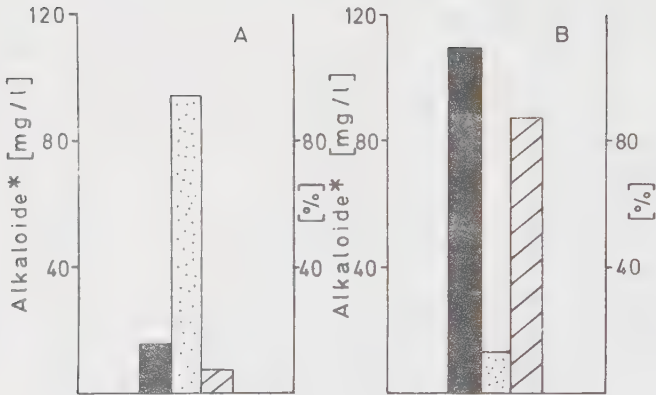


Abb. 3: Vergleich der Alkaloidgehalte eines wenig Alkaloide bildenden (A) und eines gut produzierenden (B) Stammes von *Catharanthus roseus* mit dem fluoreszenzmikroskopisch erfaßten Erscheinungsbild.

* Summe aus Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin (mg/l) (■), prozentualer Anteil der schwach oder nicht fluoreszierenden Zellen (□), prozentualer Anteil der intensiv fluoreszierenden Zellen (▨).

Die Fluoreszenzintensität und der prozentuale Anteil an intensiv fluoreszierenden Zellen waren also eindeutig mit dem Alkaloidgehalt der beiden Zellsuspensionen korreliert. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Gewebeproben lassen sich daher wenig produzierende Stämme von jenen mit hohem Alkaloidgehalt unterscheiden.

Auf diese Weise kann die Produktionsfähigkeit eines Catharanthus Stammes im Laufe der Kultivierung fortwährend durch mikroskopische Untersuchungen überprüft werden. Darüber hinaus kann diese Methode zur Selektion von Zellstämmen eingesetzt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzanregung lassen sich die Inhaltsstoffe in den Zellen selbst sichtbar machen. Die dabei beobachtete Fluoreszenzintensität ist ein geeignetes Merkmal, um gut produzierende Zellen zu erkennen und daraus Zellstämme mit hohem Alkaloidgehalt anzulegen. Für den Selektionsprozeß selbst ist die Aufarbeitung der Zellen und anschließende Analyse der Extrakte nicht erforderlich. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn Zellstämme aus einer sehr umfangreichen Zellpopulation selektiert werden sollen.

2.2. Vergleich der Alkaloidgehalte selektierter und nicht selektierter Kolonien einer Zellpopulation von Catharanthus roseus

Der Alkaloidgehalt einer großen Anzahl selektierter Zellkolonien wurde mit den Gehalten der gleichen Anzahl nicht selektierter Kolonien verglichen. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die Alkaloidgehalte selektierter Zellkolonien wirklich deutlich höher waren als die nicht selektierter Kolonien, da aufgrund des großen Stichprobenumfanges eventuell die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, hochproduzierende Zellkolonien auch ohne Selektion zu erfassen.

Zellen einer Suspensionskultur wurden in Produktionsmedium plattiert und bis zur Entwicklung von Zellkolonien von ca. 3 mm Durchmesser kultiviert. Durchschnittlich waren pro Petrischale 380 Kolonien gewachsen. Da bei diesem Plattierungsvorgang 600 Petrischalenkulturen an-

gefertigt worden waren, standen also etwa 230 000 Kolonien einer Population für die Selektion zur Verfügung. Aus dieser Population wurden zuerst, ohne ein Selektionskriterium zugrunde zu legen, 400 Kolonien entnommen, das Frischgewicht bestimmt und alkoholisch extrahiert. Danach wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop diejenigen Kolonien herausgesucht, die sich durch intensive Fluoreszenz von den anderen Kolonien deutlich unterschieden. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß Zellkolonien selektiert wurden, bei denen die Fluoreszenz aller Zellen innerhalb des Aggregates gleichmäßig gut war, da auch Zellkolonien vorhanden waren, bei denen nur ein geringer Anteil der Zellen sehr intensiv fluoreszierte, während die übrigen kaum Fluoreszenz zeigten. Von 400 auf diese Weise selektierten Kolonien wurde das Frischgewicht bestimmt und anschließend wurden sie ebenfalls extrahiert. Ein Frischgewicht von 6.35 mg entsprach dabei einem Trockengewicht von 0,346 mg. Mit dem Radioimmuntest wurden die Serpentin- und Loganin/Secologaningehalte aller so gewonnenen Extrakte gemessen und die Gehalte der einzelnen Kolonien prozentual auf ihr Trockengewicht bezogen. Anschließend wurden die Häufigkeitsverteilungen der Serpentin- und Loganin/Secologaningehalte für nicht selektierte und selektierte Zellkolonien in 21 Intervallen von 0 % - > 1,0 % ermittelt (Abbildung 4 A und 4 B).

Bei den nicht selektierten Kolonien lagen mehr als 20 % aller Serpentinegehalte im Intervall von 0,16 - 0,2 %, ein Serpentinegehalt also, der etwa dem der zum Plattieren verwendeten Suspensionskultur entsprach. Der größte Anteil der Proben verteilte sich im Bereich zwischen 0 und 0,4 %, während höhere Serpentinegehalte nur mit sehr geringer prozentualer Häufigkeit zu verzeichnen waren. Auffallend war der Unterschied der Serpentinegehalte der nicht-selektierten und selektierten Kolonien im

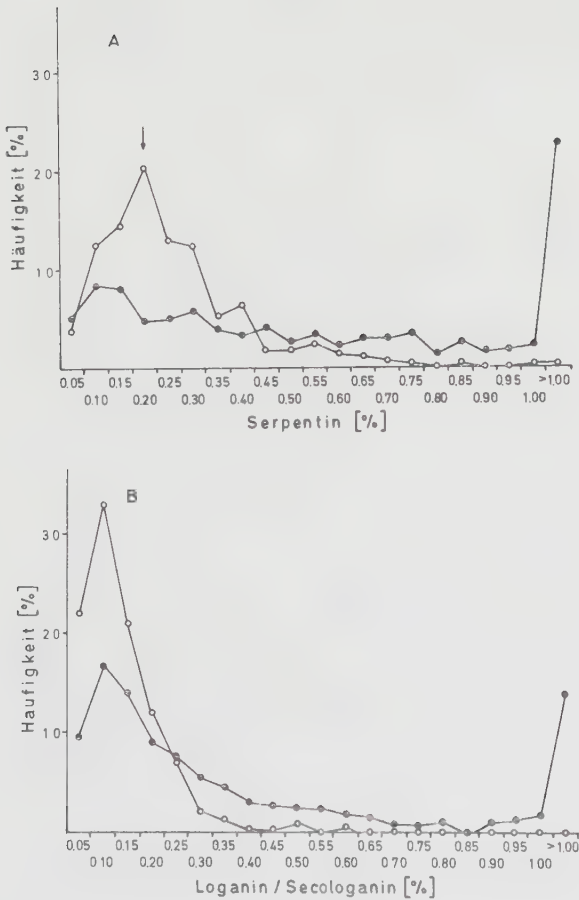


Abb. 4: Die Häufigkeitsverteilung des Serpentin (A)- und des Logenin/Secologanin Gehaltes (B) von selektierten (●—●) und nicht-selektierten (○—○) Zellkolonien von *Catharanthus roseus*.

→ Serpentinegehalt der Ausgangspopulation

Intervall mit mehr als 1,0 % Serpentin. Während bei den nicht-selektierten Kolonien nur 0,5 % der 400 untersuchten Proben mehr als 1,0 % Serpentin enthielten, waren aufgrund ihrer intensiven Fluoreszenz 23 % aller Kolonien mit mehr als 1 %igem Gehalt an Serpentin selektiert worden.

Für die Loganin/Secologaniningehalte ergab sich ein entsprechendes Verteilungsbild. Bei den selektierten Kolonien hatte die prozentuale Häufigkeit in dem Intervall zwischen 0 % und 0,2 % Loganin/Secologanin deutlich abgenommen. Dafür waren durch Selektion mehr Kolonien mit 0,25 - 1,0 %igem Loganin/Secologaniningehalt erfaßt worden. Bei den nicht-selektierten Kolonien verteilten sich die Loganin/Secologaniningehalte dagegen fast ausschließlich auf die Intervalle von 0 % bis 0,4 %. Kolonien mit mehr als 1,0 % Loganin/Secologanin waren bei den nicht-selektierten Proben überhaupt nicht vorhanden, während 14 % der selektierten Kolonien mehr als 1 % dieser Substanzen aufwiesen. Auffallend dabei war allerdings, daß auch bei den selektierten Kolonien immer noch 5 % der Proben nur 0 - 0,05 % Serpentin und 9,5 % aller Kolonien 0 - 0,5 % Loganin/Secologanin, also vergleichsweise sehr wenig dieser Inhaltsstoffe enthielten, obwohl sich auch diese Kolonien durch intensive Fluoreszenz ausgezeichnet hatten. Um zu überprüfen, ob in diesen Zellkolonien außer den untersuchten Inhaltsstoffen andere Substanzen zu finden sind, die auch wie Serpentin hellblau fluoreszierten, wurden einige Kolonieextrakte mit Serpentin als Vergleichssubstanz im Laufmittel IV chromatographiert und anschließend mit dem Fluoreszenzdünnschichtscanner gemessen. Danach zeigte sich, daß in der Tat in einigen Extrakten außer dem Serpentin eine weitere hellblau fluoreszierende, sehr polare Substanz unbekannter Struktur enthalten war, die in

dem verwendeten Laufmittel am Startpunkt des Chromatogrammes liegengeblieben war. Bei der Selektion der Zellkolonien war diese Substanz offensichtlich als Selektionsmerkmal mit erfaßt worden, so daß unter den 400 untersuchten Kolonien solche auftraten, die zwar intensiv fluoreszierten, deren Fluoreszenz aber nur zum Teil vom Serpentin selbst verursacht worden war, so daß die Serpentinegehalte trotz intensiver Fluoreszenz vergleichsweise niedrig waren. Trotzdem haben die Serpentin- und Loganin/Secologaninergehalte selektierter Zellkolonien erwiesen, daß es durch Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie gelingt, hochproduzierende Zellkolonien gezielt aus einer sehr großen Zellpopulation herauszufinden. Da Loganin/Secologanin selbst nicht fluoreszieren, ihr Gehalt aber, ebenso wie der Serpentinegehalt, in selektierten Kolonien überdurchschnittlich hoch war, ist also auch hier ein hoher Serpentinegehalt mit einem hohen Gehalt der Vorstufe Loganin/Secologanin korreliert.

Für die Selektion von 400 Kolonien waren alle 600 Petrischalen, die bei einem Plattierungsvorgang angelegt worden waren, untersucht worden. Dabei wurde jede Petrischale systematisch mikroskopiert, wobei alle Kolonien einer Petrischale erfaßt wurden. Innerhalb zweier Arbeitstage konnten so alle 230 000 Kolonien dieser Population visuell getestet werden, um Zellkolonien mit intensiver Fluoreszenz aus dieser Population zu gewinnen. Wären alle diese Kolonien extrahiert und anschließend mit dem Radioimmunoassay untersucht worden, hätte man nur zum Bestimmen von Serpentin bei einer Probenkapazität von 500 Proben pro Tag und Person 460 Arbeitstage nur allein zur immunologischen Analyse aller Kolonien benötigt. Die Fluoreszenzmikroskopie kann daher sehr vorteilhaft zum Screening einer sehr großen Zellpopula-

tion eingesetzt werden, falls die gesuchte Substanz unter UV-Anregung fluoresziert. Die exakte Bestimmung der Inhaltsstoffe kann dann anschließend mit Hilfe des Radioimmuntests an einer zuvor mikroskopisch getroffenen Auswahl an Zellkolonien durchgeführt werden. Dadurch läßt sich die Erfolgchance, Hochleistungsstämme zu selektieren, enorm verbessern.

2.3. Selektierte Zellstämme mit erhöhter Alkaloidproduktion

Um selektierte Zellkolonien aseptisch weiter kultivieren zu können, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen unter sterilen Bedingungen durchgeführt (vgl. II.6). Die Zellkolonien, die sich auf Produktionsmedium entwickelt hatten, wurden nach der Selektion zuerst auf konditioniertem Wachstumsmedium in den Kammern von Mikrotiterplatten zur Teilung gebracht. Die Verwendung von Mikrotiterplatten ermöglichte dabei auch die Kultivierung sehr kleiner Kolonien. Durch das kleine Volumen der Kammern war ein optimales Verhältnis von Mediummenge zur Zellzahl gewährleistet, so daß ein gutes Wachstum der Zellen einsetzte, das zudem noch durch zuvor erfolgte Konditionierung des Mediums unterstützt wurde. Nach 14 Tagen konnten die herangewachsenen Kolonien bereits auf Agarmedium in Petrischalen übertragen werden, auf dem sie sich in kurzer Zeit zu gut wachsenden Kallusstämmen entwickelten. Von diesen Stämmen wurden Suspensionskulturen angelegt, deren biosynthetische Fähigkeiten nach einer Passage auf Produktionsmedium untersucht wurden. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung von Zellstämmen, die als Suspensionskulturen deutlich erhöhte Alkaloidbildung zeigten, und die sich aus Zellkolonien entwickelt hatten, die aufgrund ihrer intensiven Fluores-

zenz aus einer Population von durchschnittlich fluoreszierenden Kolonien selektiert worden waren. Stamm 1/10 wies den höchsten Alkaloidgehalt (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) mit 418,5 mg/l auf und übertraf den Stamm II6H (308 mg/l), der während früherer fluoreszenzmikroskopischer Selektionen angelegt worden war (DEUS, 1977), um 110 mg/l.

Die Methode, intensiv fluoreszierende Kolonien zu selektieren, um aus ihnen Zellstämme mit gesteigerter Alkaloidproduktion zu erhalten, hat sich also als sehr geeignet erwiesen, um Alkaloid-überproduzierende Stämme von Catharanthus roseus zu etablieren.

Stamm	Serpentin (mg/l)	Ajmalicin (mg/l)	Tetrahydro- alstonin (mg/l)	Summe (mg/l)
1/1	119.4	32.6	5.7	157.7
1/7	132.2	14.7	0	146.9
1/9	22.8	150.3	24.8	198.0
1/10	27.6	368.1	22.8	418.5
1/13	141.7	28.0	6.6	176.3
1/16	79.3	97.8	33.4	210.5

Tabelle 4: Selektierte Zellstämme von Catharanthus roseus mit erhöhter Alkaloidproduktion.

2.4. Variante Zellstämme von Ruta chalepensis

Die nach fluoreszenzmikroskopischer Selektion an Zellen von Catharanthus roseus erhaltenen Ergebnisse ließen vermuten, daß sich diese Methode auch auf Gewebe anderer Pflanzenarten anwenden läßt, sofern sie Inhaltsstoffe besitzen, die nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlängen intensiv fluoreszieren. Zu diesem Zweck wurden Zellen aus einer homogen wachsenden Suspensionskultur von Ruta chalepensis plattiert und die herangewachsenen Zellkolonien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zellen von Ruta chalepensis, die als Submerskultur im Dauerlicht wachsen, sind einheitlich hellgelb gefärbt. Auch die nach dem Plattieren gewachsenen Kolonien wiesen keine makroskopisch sichtbaren morphologischen oder farblichen Unterschiede auf. Für die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde bei diesen Zellen die Filterkombination zur Blauanregung verwendet.

Auch bei diesem Gewebe traten deutliche Unterschiede im fluoreszenzmikroskopischen Erscheinungsbild zwischen den Kolonien einer Population auf. Nicht nur die Fluoreszenzintensität variierte stark zwischen den einzelnen Kolonien, sondern auch die Fluoreszenzfarben waren eindeutig verschieden. Neben grün oder gelb fluoreszierenden Kolonien waren orange oder orange-rote Zellaggregate in den Petrischalen enthalten. Diese farblichen Abweichungen lassen vermuten, daß die Zellen einer Population fähig sind, unterschiedliche Sekundärstoffe zu bilden und diese verschieden stark anzureichern. Aus den Kolonien von Ruta chalepensis wurden intensiv grün und intensiv orange fluoreszierende Zellaggregate selektiert und zu Kalluskulturen herangezogen. Zellen dieser Kallusstämmen wurden nach einigen Passagen in Flüssigmedium übertragen.

2.4.1. Makroskopische und mikroskopische Charakterisierung

Nach der Anlage von Suspensionskulturen wurden die Unterschiede zwischen den selektierten Zellstämmen auch makroskopisch sichtbar. Aus der ursprünglich hellgelb gefärbten Ausgangskultur waren deutlich veränderte Tochterstämme hervorgegangen. Aus Gewebe von Kolonien, die intensiv orange fluoreszierten (Stamm O), wurden Suspensionskulturen angelegt, die durch ihre intensive grüne Farbe auffielen. Daß diese Grünfärbung nicht auf gesteigerte Chlorophyllbildung zurückzuführen war, konnte ebenfalls mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht werden. Chlorophyll besitzt eine auffallende kirschrote Fluoreszenz, doch in Suspensionen von Stamm O waren nur sehr wenige Zellen vorhanden, die durch enthaltenes Chlorophyll kirschrot fluoreszierten und Chloroplasten-Strukturen aufwiesen. Suspensionskulturen vom Stamm G waren aus intensiv grün fluoreszierenden Kolonien herangezogen worden. Die Zellen waren in der Suspension gelb gefärbt, die Färbung war aber deutlich intensiver als die der Ausgangskultur. Während der zum Plattieren verwendete Ausgangsstamm und der daraus angelegte Stamm O als homogene Suspensionen mit sehr kleinen Zellaggregaten aus ca. 10 Zellen wuchsen, bildete Stamm G in Flüssigmedium auch makroskopisch gut sichtbare große Zellaggregate von etwa 0,4 cm Durchmesser. Die farblichen Unterschiede in der Fluoreszenz, die als Selektionskriterium für die Anlage von Stamm O und Stamm G gedient hatten, konnten auch bei mikroskopischen Untersuchungen der daraus angelegten Zellsuspensionen festgestellt werden. Auch die Zellen, die bereits über mehrere Passagen kultiviert worden waren, hatten diese Charakteristika beibehalten.

2.4.2. Variationen im Muster der Inhaltsstoffe

An Kulturen von Ruta graveolens konnte nachgewiesen werden, daß kultivierte Zellen zur Bildung von Acridin-Alkaloiden befähigt sind (REINHARD et al., 1968). Um zu überprüfen, ob die Farbunterschiede der Zellen varianter Stämme von Ruta chalepensis durch den Gehalt an verschiedenen Inhaltsstoffen hervorgerufen wurden, wurde Gewebe von beiden Stämmen alkoholisch extrahiert, Proben der Extrakte in den Laufmitteln I, II und III chromatographiert und die Substanzflecken auf den Chromatogrammen unter dem Licht einer UV-Lampe verglichen. Mit Laufmittel I konnte aus dem Extrakt von Stamm O keine Substanz abgetrennt werden, der aufgetragene Extrakt war vollständig am Startpunkt des Chromatogrammes liegengeblieben. Aus dem Extrakt vom Stamm G waren unter denselben Bedingungen eine intensiv hellgrüne und violett fluoreszierende Substanz aufgetrennt worden, die in Gewebe vom Stamm O nicht gebildet worden waren. Deutliche Unterschiede zeigten sich auch nach der Chromatographie in Laufmittel II. Der Extrakt von Stamm G trennte sich in vier violett fluoreszierende und eine grün fluoreszierende Substanz auf, von denen nur eine violette mit dem Rf-Wert 0.79 auch in Gewebe von Stamm O nachgewiesen werden konnte. In Laufmittel III blieb diese Substanz mit den Rf-Wert 0.04 knapp oberhalb des Startpunktes liegen. Auch mit diesem Laufmittel ließen sich weitere Substanzen nur im Extrakt von Stamm G nachweisen.

Die chromatographische Analyse der Extrakte zeigte also, daß die unterschiedliche Fluoreszenz der Zellen tatsächlich durch verschiedene Inhaltsstoffe hervorgerufen worden war. Mit den drei verwendeten

Laufmitteln konnte nur eine Substanz gefunden werden, die in den Zellen beider Stämme enthalten war. Stamm G enthielt ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen, während Stamm O deutlich weniger Sekundärstoffe gebildet hatte, die zudem in den hier verwendeten Laufmitteln nicht aufgetrennt werden konnten. Als Selektionsmerkmal hatte offensichtlich die in den Extrakten von Stamm G enthaltene grün fluoreszierende Substanz gewirkt, die im Gewebe von Stamm O nicht gebildet worden war.

2.5. Zellstämme verschiedener Eschscholtzia-Arten

Als weitere Modelle zur Selektion von varianten Stämmen mit der fluoreszenzmikroskopischen Methode wurden Zellpopulationen von Eschscholtzia californica, Eschscholtzia douglasii und Eschscholtzia tenuifolia untersucht. Zellen dieser Stämme sind in der Suspensionskultur rotviolett (E. californica) oder rotbraun (E. douglasii und E. tenuifolia) gefärbt. Es ist bekannt, daß differenzierte Pflanzen verschiedener Eschscholtzia-Arten fluoreszierende Isochinolinalkaloide enthalten (SLAVIKOVA und SLAVIK, 1966; SLAVIK und DOLEJS, 1973; GERTIG, 1964 a; GERTIG, 1964 b), eine fluoreszenzmikroskopische Selektion sollte also auch bei Zellen dieser Pflanzenarten durchführbar sein. Die Untersuchungen der Zellkolonien wurden in diesem Fall mit der Filterkombination zur Fluoreszenzanregung im UV-Bereich durchgeführt.

2.5.1. Selektion von Zellkolonien

An Zellkolonien, die sich aus plattierten Zellen von E. californica entwickelt hatten, konnten schon makroskopisch gut sichtbare Unterschiede festgestellt werden.

Die überwiegende Zahl der Kolonien war dunkelrot gefärbt, während mit geringerer Häufigkeit vollkommen farblose Zellaggregate in der Population vorhanden waren. Im Licht des Fluoreszenzmikroskops fluoreszierten diese farblosen Kolonien einheitlich hellgrün, während die makroskopisch roten Kolonien rotviolette aber auch blaue Fluoreszenz zeigten. Intensiv grün (Stamm G) und rotviolett (Stamm R) fluoreszierende Kolonien wurden getrennt weiterkultiviert und zu Kallusstämmen aufgezogen.

Auch bei Kolonien von E. douglasii konnten mit bloßem Auge bereits farblose Kolonien von rotbraunen Kolonien unterschieden werden, allerdings zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop auch in diesem Fall, daß die makroskopisch so einheitlich aussehenden rotbraunen Aggregate anscheinend verschiedene Stoffe akkumuliert hatten. Sie fluoreszierten rotviolett, andere dunkelblau, in vielen Aggregaten waren auch beide Fluoreszenzfarben vertreten. Die makroskopisch farblosen Kolonien fluoreszierten dagegen einheitlich hellblau. Es konnten unter ihnen keine Kolonien festgestellt werden, die irgendeine andere Fluoreszenzfarbe aufwiesen. Zur weiteren Kultivierung wurden diese hellblau fluoreszierenden Aggregate (Stamm HB) und intensiv rotviolette Kolonien (Stamm V) selektiert.

Bei Zellkolonien aus Gewebe von E. tenuifolia traten diese makroskopisch farblosen Zellaggregate ebenfalls auf, und auch in diesem Fall waren sie durch uniforme türkisfarbene Fluoreszenz deutlich von den übrigen Kolonien der Population zu unterscheiden. Die makroskopisch einheitlich roten Kolonien wiesen im Gegensatz dazu ein weites Spektrum unterschiedlicher Fluoreszenzfarben auf. Es konnten rotviolette, kirschrote, blaue

orangene, grüne und dunkelgrün fluoreszierende Kolonien festgestellt werden. Selektiert wurden aus diesem Gewebe Kolonien, die intensiv türkis fluoreszierten (Stamm T) und solche, die sich durch besonders intensive orangefarbene Fluoreszenz (Stamm F/O) von den übrigen Kolonien unterschieden.

2.5.2. Charakterisierung der angelegten Zellstämme

An den herangewachsenen Kalluskulturen konnte ein Phänomen beobachtet werden, das bei Gewebe aller dieser drei Eschscholtzia-Arten gleichermaßen auftrat. Kalluskulturen der Stämme G, HB und T bestanden aus einheitlich farblosem Gewebe, das dieses Fluoreszenzmerkmal über alle erfolgten Passagen (ca. 40 Passagen) beibehalten hatte. Während der Kultivierung der Stämme R, V und F/O traten dagegen nach einigen Passagen kleine vollkommen farblose Zellbezirke auf, die sich deutlich von dem normalerweise rötlich gefärbten Kallusgewebe unterschieden. Wurden Proben von dem Kallusgewebe der selektierten Zellstämme unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, zeigte sich auch hier, daß die Zellen der farblosen Stämme vollkommen homogen in ihrer spezifischen Farbe fluoreszierten, während sich Proben des roten Kallusgewebes aus farblich verschiedenen fluoreszierenden Zellen zusammensetzten.

An diesen Beispielen wird abermals deutlich, daß es möglich war aus einer Population von Zellen, die zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen fähig waren, Zellstämme zu isolieren, die sich in Hinsicht auf die Bildung ihrer Inhaltsstoffe h o m o g e n und s t a b i l erwiesen hatten.

Besonders auffallend waren die Unterschiede zwischen den selektierten Stämmen von Eschscholtzia californica, nachdem aus dem Kallusgewebe Suspensionskulturen angelegt worden waren (Abbildung 5). Auch in der Submerskultur hat sich die Stabilität von Stamm G bewiesen. Im Laufe einer mehr als einjährigen Kultivierung traten keine makroskopisch und mikroskopisch sichtbaren Veränderungen des Gewebes auf.



Abb. 5: Variante Zellstämme von Eschscholtzia californica, die nach fluoreszenzmikroskopischer Selektion angelegt worden waren.

Ob die äußerlich sichtbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellstämmen auch, wie bei Ruta chalepensis schon gezeigt, auf ein variantes Muster an Inhaltsstoffen hindeuten, wurde an den Stämmen G und R von Eschscholtzia californica untersucht. Die Zellen wurden alkoholisch extrahiert und die Extrakte auf Kieselgelfertigplatten im Laufmittel VIII aufgetrennt. Der Extrakt von Zellen des Stammes R trennte sich in acht Substanzen auf, während sich mit dem hier verwendeten Laufmittel aus dem Extrakt von Stamm G nur drei Substanzen nachweisen ließen. Eine dieser Substanzen mit dem Rf-Wert 0.26 war mit der aus dem Gewebe des Stammes R identisch. Auf dem Chromatogramm des Extraktes G trat eine intensiv grün fluoreszierende Substanz mit dem Rf-Wert 0.55 besonders in Erscheinung, die im Extrakt vom Stamm R nicht nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich hatte dieser Inhaltsstoff bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen als Selektionsmerkmal für Stamm G gedient. Bei diesen Untersuchungen waren die Inhaltsstoffe von Eschscholtzia californica noch nicht näher charakterisiert worden. Eine genauere Analyse sollte mit Gewebe des Stammes R durchgeführt werden. Hierfür wurden Zellen dieses Stammes in größerem Maßstab (3 kg), wie in Kap. II.4. beschrieben, aufgeschlossen, extrahiert und der gewonnene wäßrige Extrakt fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden in den Laufmitteln V, VI und VII durch präparative Schichtchromatographie aufgetrennt. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen konnte Protopin in Fraktion A gefunden werden. Diese Bande wurde vom Kieselgel mit Methanol eluiert und das Eluat bis zur Trockne eingeengt. Von Proben der so gewonnenen Substanz wurden zum Überprüfen ihrer Identität Infra-Rot und Massenspektren aufgenommen. Das Infra-Rot-Spektrum [IR (ν): 1655(C=O); 1611(arom.C=C); 1498; 1484; 1452; 1363; 1235; 1040 cm^{-1}] zeigte eindeutige Über-

einstimmung mit dem der Vergleichssubstanz, das Massenspektrum [MS; m/e (Rel.Int.%): 148(100), 163(22), 190(15), 353(M⁺, 4)] entsprach den Literaturwerten (HESSE und BERNHARD, 1975), die aus Stamm R von Eschscholtzia californica isolierte Substanz konnte also als Protopin identifiziert werden. Protopin fluoresziert bei UV-Anregung hellgrün. Auch in Extrakten des Stammes G war eine hellgrün fluoreszierende Substanz nachgewiesen worden. Dabei konnte es sich aber nicht um Protopin gehandelt haben, da die unbekannte Substanz einen anderen Rf-Wert besaß und in Extrakten des Stammes R nicht gefunden wurde.

Hinweis auf das Vorhandensein eines weiteren Alkaloids, des Sanguinarin, ergab ein anderer Versuch, bei dem ein alkoholischer Extrakt von Gewebe des Stammes R analysiert wurde. Der Extrakt wurde auf Kieselgelfertigplatten mit Sanguinarin als Referenzsubstanz im Laufmittel IV chromatographiert. Die mit der Referenz übereinstimmende Bande wurde im Elutor mit Methanol vom Kieselgel eluiert und das Absorptionsspektrum des Eluates im UV-Bereich aufgenommen. Die erhaltenen Absorptionsmaxima bei 234, 283 und 325 nm stimmten mit denen der ebenfalls spektrometrisch untersuchten Referenz überein. Sanguinarin konnte also ebenfalls als Inhaltsstoff der Suspensionskulturen von Eschscholtzia californica identifiziert werden.

Zur chromatographischen Untersuchung von Gewebe anderer Eschscholtzia-Arten wurden Kalluszellen von Eschscholtzia douglasii Stamm HB alkoholisch extrahiert. Der Extrakt wurde auf HPTLC-Platten im Laufmittel VI mit 20 zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen co-chromatographiert. Es konnten dabei nur zwei Substanzen gefunden werden, die in Farbe und Rf-Wert mit den in dem Extrakt

enthaltenen Substanzen übereinstimmten. Dabei handelte es sich um Sanguinarin und Escholidin. Die blaue Fluoreszenz des Escholidins stimmte farblich mit der blauen Fluoreszenz der Zellkolonien überein, die als Merkmal zur Selektion von Stamm HB gedient hatte.

Auch an Zellkolonien von verschiedenen Eschscholtzia-Arten konnte somit die Methode der fluoreszenzmikroskopischen Selektion erfolgreich angewendet werden. Aus sehr heterogenen Zellpopulationen, deren Zellen zur Bildung unterschiedlicher Muster von Inhaltsstoffen befähigt waren, ließen sich Zellstämme isolieren und kultivieren, die sich besonders durch ihre stabile Produktbildung auszeichneten. Es war also mit der hier angewendeten Selektionsmethode nicht nur möglich, Zellen zu unterscheiden, die in der Quantität der Sekundärstoffe variierten, sondern gezielt auch solche Zellen zu trennen, die in der Qualität der gebildeten Produkte deutlich verschieden waren.

Die Selektion mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich also erfolgreich an verschiedenen Pflanzenarten mit sehr unterschiedlichen Inhaltsstoffen (Indolalkaloide, Acridin-Alkaloide, Isochinolinalkaloide) anwenden. Aus einer Zellpopulation ließen sich Zellstämme mit verschiedenen biochemischen Leistungen selektieren, die Ursache für das Auftreten dieser Variationen ist allerdings noch unbekannt. Allgemein läßt sich feststellen, daß diese Selektionsmethode hoch geeignet ist für die Isolierung varianter und hochproduzierender Zellstämme aus makroskopisch homogen erscheinenden Populationen pflanzlicher Zellkulturen.

3. Kinetische Untersuchungen an Zellsuspensionskulturen von Catharanthus roseus

Zellen, die in einem Erlenmeyerkolben als Suspensionen kultiviert werden, wachsen als statische Kultur, d.h. es werden dem System während des Wachstums weder Zellen noch Nährstoffe zugefügt oder entzogen. Der Wachstumsverlauf der Zellen zeigt dabei die gleichen Merkmale, wie sie für Submerskulturen von Mikroorganismen charakteristisch sind (vgl. REHM, 1971). Nach dem Übertragen in frisches Medium setzt das Zellwachstum erst nach abgeschlossener lag-Phase ein, in der selbst noch keine Zellteilungen stattfinden. In der darauffolgenden exponentiellen Entwicklungsphase finden logarithmisch verlaufende Teilungen statt, sie ist die Phase des maximalen Wachstums. Nach einer kurzen Übergangsphase, in der lineares Wachstum stattfindet, wird die stationäre Phase erreicht. In diesem Stadium besteht ein Gleichgewicht zwischen neugebildeten und absterbenden Zellen, die absolute Zellzahl bleibt dabei gleich. Sind die Nährstoffe, z.B. Saccharose, im Medium verbraucht oder haben sich toxische Stoffwechselendprodukte im Medium angereichert, setzt verstärkt Autolyse der Zellen ein. Es sterben mehr Zellen ab als neu gebildet werden und damit ist die letale Wachstumsphase erreicht.

Bisher sind nur wenige Studien zur Bildung der Sekundärstoffe während des Wachstums einer Zellkultur gemacht worden, obwohl gerade kinetische Untersuchungen dazu beitragen können, wichtige Informationen über die Produktion von Inhaltsstoffen durch kultivierte Zellen zu erhalten. Maximale Produktbildung kann zu sehr unterschiedlichen Zeiten der Wachstumskurve einer statischen Kultur stattfinden. Nach dem Zeitpunkt der höchsten Produktbildung lassen sich drei Typen charakterisieren.

Wachstum und Sekundärstoffbildung können streng parallel verlaufen, wie es bei der Serpentinbildung durch Catharanthus roseus Suspensionskulturen der Fall war (ZENK et al., 1977).

Anders war es bei Kalluskulturen von Ruta graveolens, die im Licht kultiviert nach 4 Wochen maximale Bildung ätherischer Öle aufwiesen. Nach diesem Zeitpunkt nahm die Produktbildung wieder ab, während das Wachstum der Kulturen weitere zwei Wochen lang exponentiell verlief und dann erst in die stationäre Phase eintrat (CORDUAN und REINHARD, 1972). In diesem Fall wurden die Sekundärstoffe also nur in der logarithmischen Wachstumsphase maximal gebildet.

Der Zeitpunkt der höchsten Stoffwechselaktivität zur Bildung von Sekundärstoffen kann auch sehr spät, erst in der stationären Wachstumsphase, auftreten, wie es bei der Synthese von Diosgenin durch Suspensionskulturen von Dioscorea deltoidea der Fall war (KAUL et al., 1969). Solche Entkopplung der Produktbildung vom Wachstum der Zellkultur konnte auch an Kulturen von Catharanthus roseus (ZENK et al., 1977) und Morinda citrifolia (SCHULTE, 1978) beobachtet werden, wenn die Suspensionskulturen nicht in Erlenmeyerkolben, sondern in größerem Maßstab in einem 22 l Airlift-Fermenter kultiviert worden waren. Diese beiden Beispiele zeigen, daß der zeitliche Verlauf der Produktbildung auch durch äußere Faktoren, in diesem Fall durch Mediumvolumen und Kulturgefäß, beeinflußt werden kann. Kinetische Untersuchungen von Wachstum und Produktion sind daher erforderlich, um den günstigsten Zeitpunkt zum Extrahieren des Gewebes festlegen zu können und so maximale Produktausbeuten zu erzielen, und darüber hinaus Einblicke in die Regulation der Sekundärstoffbildung zu erhalten.

3.1. Charakterisierung verschiedener Stämme in Bezug auf Wachstum und zeitliche Abhängigkeit der Alkaloidbildung

Zur kinetischen Untersuchung von Wachstum und Alkaloidbildung wurden sechs Stämme von Catharanthus roseus verwendet, die zuvor aus einer Zellpopulation mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie selektiert worden waren. Die Zellen dieser Stämme wuchsen in je 25 ml Produktionsmedium. Kulturbedingungen und die als Inoculum verwendeten Gewebemengen waren bei allen Stämmen gleich. In 1 - 3 tägigem Abstand wurden je zwei Parallelproben pro Stamm aufgearbeitet. Es wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt und zur Analyse der Inhaltsstoffe alkoholische Extrakte hergestellt, deren Alkaloidgehalte mit dem Radioimmuntest und nach vorangegangener Chromatographie auch fluorimetrisch gemessen wurden.

In Abbildung 6 A - F sind die Ergebnisse dieser kinetischen Untersuchungen dargestellt. Sowohl der Verlauf des Wachstums als auch die Zeitpunkte und die Höhe der maximalen Alkaloidgehalte sind bei allen der sechs untersuchten Zellstämme deutlich verschieden. Obwohl bei allen Stämmen die gleiche Zellzahl zum Animpfen der Kulturen verwendet worden war, das Alter der Vorkulturen gleich war und die Zellen gleiche Bedingungen vorfanden, traten die ersten Zellteilungen nach verschieden lang andauernden lag-Phasen ein. Eine kurze lag-Phase von nur zwei Tagen wurde bei den Stämmen B, D und F beobachtet, während es bei Stamm C drei Tage und bei Stamm E vier Tage dauerte, bis exponentielles Wachstum der Zellen einsetzte. Stamm A hatte mit sechs Tagen eine dreifach längere lag-Phase als die Stämme B, D und F. Die sich anschließende Zeit maximalen Zellwachstums (exponentielle Phase) erstreckte sich über einen Zeitraum von acht Tagen (Stamm D und F), neun

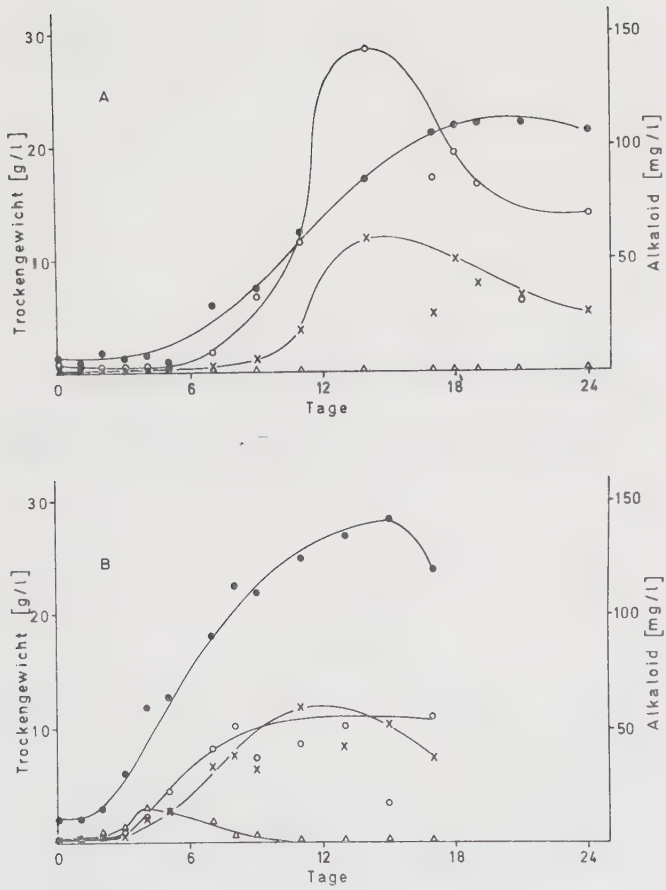
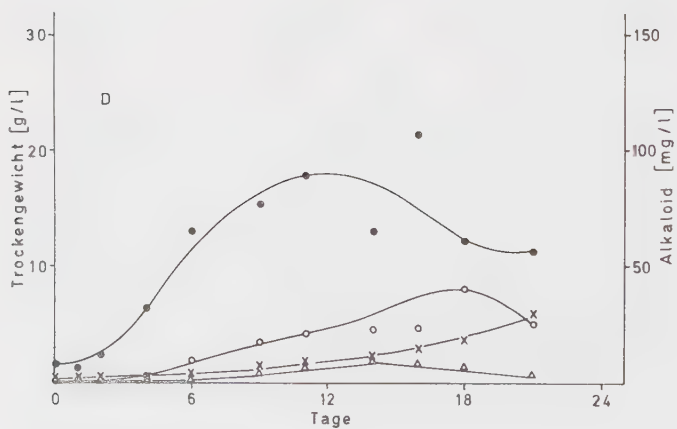
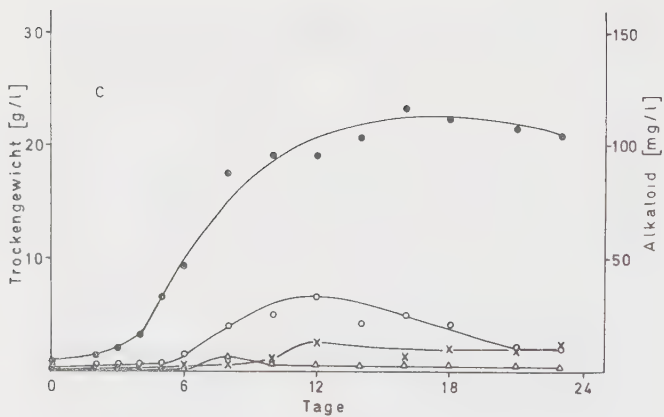
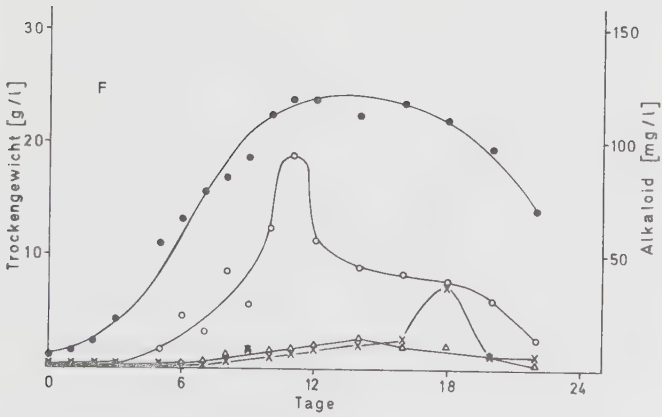
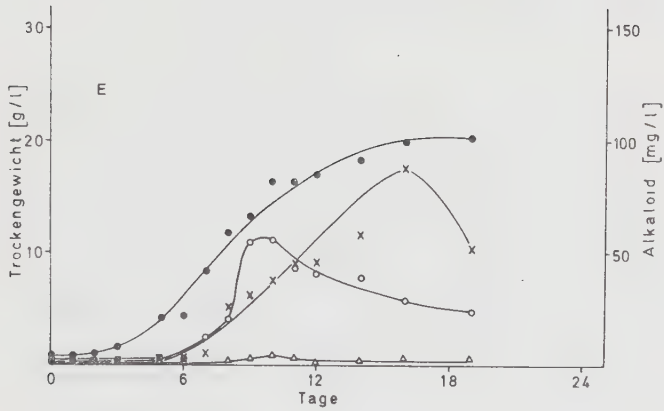


Abb. 6: Die Änderung des Trockengewichtes (●-●), des Serpentin- (x - x), Ajmalicin- (○-○) und des Tetrahydroalstonine- haltes (Δ - Δ) während der Kultivierung verschiedener Zell- stämme von Catharanthus roseus.





Tagen (Stamm B und C) zehn Tagen (Stamm E) und zwölf Tagen (Stamm A), so daß auch der Übergang in die stationäre Phase bei den untersuchten Stämmen zu sehr verschiedenen Zeitpunkten einsetzte. Stamm A beendete nach 18tägiger Kultivierung das exponentielle Wachstum und zeigte nach weiteren vier Tagen stationären Wachstumsverlaufs eine leichte Abnahme des Trockengewichtes bei einsetzender letaler Phase. Das Zellwachstum von Stamm B erreichte bereits nach 13 Tagen das stationäre Stadium, das nur zwei Tage anhielt und sofort in die letale Phase überging, wobei ein starker Abfall des Trockengewichtes festzustellen war. Eine lange stationäre Phase von neun Tagen konnte bei Wachstum von Stamm C beobachtet werden, die bereits am 12. Tage des Versuches eingesetzt hatte und nur von einer geringfügigen Abnahme des Trockengewichtes am Ende der Kultivierung abgeschlossen wurde. Das maximale Zellwachstum von Stamm D war bereits nach 10tägiger Kultivierung abgeschlossen, wurde von einer kurzen stationären Phase von vier Tagen abgelöst und schon am 14. Tag der Kultivierung konnte durch deutliche Abnahme des Trockengewichtes das Einsetzen der letalen Phase festgestellt werden. Bei Stamm E verlief das Zellwachstum bis zum 14. Tag der Kultivierung exponentiell und ging danach in die stationäre Phase über, die bis zum Ende dieses Versuchs am 19. Tag der Kinetik anhielt. Der Übergang in die letale Phase war bis zu diesem Zeitpunkt bei Stamm E noch nicht eingetreten. Stamm F ähnelte in seinem Wachstumsverhalten dem des Stammes D. Auch er hatte eine lag-Phase von zwei Tagen, wuchs dann acht Tage exponentiell und ging am 10. Tag der Kultivierung in die stationäre Phase über. Bei Stamm F dauerte die stationäre Phase zwei Tage länger als bei Stamm D, aber auch hier machte sich das Einsetzen der letalen Phase durch deutliche Abnahme des Trockengewichtes bemerkbar.

Für die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Alkaloidbildung wurde die Produktion von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin gemessen und mit dem Verlauf der Wachstumskurven verglichen.

Stamm A: Bei diesem Stamm konnte am 11. Tag der Kinetik eine deutliche Zunahme des Serpentinegehaltes festgestellt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt waren in dem Gewebe nur Spuren von Serpentin vorhanden. Die Serpentin-synthese setzte fünf Tage nach Beginn des exponentiellen Zellwachstums vermehrt ein und lief dann bis zum Erreichen des maximalen Serpentinegehaltes (60 mg/l) am 14. Tag der Zunahme des Trockengewichtes parallel. Bereits drei Tage später, beim Übergang des Wachstums in die stationäre Phase, hatte der Serpentinegehalt der Zellen wieder deutlich abgenommen und sank bis zum Ende der stationären Phase bis auf 50 % des maximalen Serpentinegehaltes ab. Die Ajmalicinsynthese von Stamm A war bis zum Erreichen des maximalen Gehaltes am 14. Tag genau mit dem Zellwachstum korreliert. Am 14. Tag betrug der Ajmalicingehalt dieses Stammes 143 mg/l. Während sich das Zellwachstum in der stationären Phase befand, nahm auch der Ajmalicingehalt des Gewebes kontinuierlich bis zum Ende der Kultivierung ab. Der Zeitpunkt maximaler Alkaloidbildung in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase war also bei Stamm A für Serpentin und Ajmalicin gleich. Zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung konnte Tetrahydroalstonin im Gewebe dieses Stammes nachgewiesen werden. Durch die fehlende Bildung dieses Alkaloids unterschied sich Stamm A von den übrigen kinetisch untersuchten Zellstämmen.

Stamm B: Auch bei diesem Stamm verliefen Serpentin- und Ajmalicinsynthese in etwa parallel; er unterschied sich von Stamm A aber durch seine Fähigkeit zur Bildung von

Tetrahydroalstonin. Die Alkaloidsynthese von Serpentin und Ajmalicin begann im Vergleich zum Wachstum mit einer um einen Tag verlängerten lag-Phase und lief dann dem Wachstum parallel. Der Serpentinegehalt der Zellen war am 11. Tag der Kinetik am höchsten (60 mg/l), nahm dann aber trotz anhaltendem Zellwachstum wieder deutlich ab. Im Gegensatz dazu wurde Ajmalicin von den Zellen akkumuliert, denn nach Erreichen des höchsten Gehaltes am 8. Tag (51 mg/l) blieb der Ajmalicingehalt von Stamm B bis zum Ende der Kinetik konstant. Die Bildung von Tetrahydroalstonin setzte bereits am Ende der lag-Phase am 2. Tag der Kinetik ein. Am 4. Tag der Kultivierung war schon der maximale Tetrahydroalstoningehalt der Zellen (14 mg/l) erreicht und schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nahm der Tetrahydroalstoningehalt wieder deutlich ab. Nach dem 10. Tag konnte kein Tetrahydroalstonin in den Zellen des Stammes B mehr nachgewiesen werden. Während Tetrahydroalstonin im Gewebe abnahm, setzten parallel zueinander die Synthesen von Serpentin und Ajmalicin ein.

Stamm C: In den Zellen von Stamm C war die Serpentinbildung stark verzögert. Erst am 8. Tag der Kultivierung, also sechs Tage nach Beginn des logarithmischen Wachstums der Zellen, konnte eine leichte Zunahme des Serpentinegehaltes gemessen werden. Davor war Serpentin nur in Spuren im Gewebe vorhanden. Am 12. Tag, an dem die Zellen bereits die stationäre Phase erreicht hatten, wurde der höchste Serpentinegehalt dieses Gewebes gemessen. Er war mit 16 mg/l im Vergleich zu den anderen Stämmen sehr niedrig. Bis zum Ende des Versuchs blieb der Serpentinegehalt der Zellen konstant. Vor dem Einsetzen der Serpentinbildung hatte die Bildung von Tetrahydroalstonin bereits am 8. Tag ihr Maximum (6 mg/l) erreicht. Bis zur maximalen Serpentinbildung war Tetrahydroalstonin in den Zellen bereits auf seinen Minimalwert abge-

sunken. Mit einsetzender Bildung von Tetrahydroalstonin wurde nach dem 5. Tag der Kinetik auch Ajmalicin vermehrt synthetisiert und erreichte, ebenso wie Serpentin, am 12. Tag beim Übergang des Wachstums in die stationäre Phase seinen höchsten für dieses Gewebe gemessenen Wert (33 mg/l). Danach nahm der Ajmalicingehalt der Zellen bereits in der stationären Wachstumsphase wieder deutlich ab. Bei Stamm C wird also Serpentin in den Zellen akkumuliert, während Ajmalicin nach Erreichen des Maximums wieder abnimmt. Die Bildungsmuster dieser beiden Alkaloide zeigten daher bei Stamm C ein genau umgekehrtes Verhalten als bei Stamm B, außerdem war die Menge aller drei gebildeten Alkaloide bei Stamm C deutlich niedriger.

Stamm D: Maximale Gehalte an Serpentin und Ajmalicin konnten im Gewebe dieses Stammes erst in der letalen Phase gemessen werden, nachdem die Wachstumskurve bereits wieder deutlich abgefallen war. Vom 4. Tag der Kinetik konnte eine geringfügige aber stetige Zunahme von Serpentin und Ajmalicin beobachtet werden. Der Ajmalicingehalt erreichte am 18. Tag den höchsten gemessenen Wert (40 mg/l) und fiel bis zum Ende der Kinetik am 21. Tag wieder ab, der höchste Serpentinegehalt (28 mg/l) wurde dagegen erst am letzten Tag der Kultivierung erreicht. Maximale Bildung von Tetrahydroalstonin konnte etwas früher noch am Ende der stationären Phase festgestellt werden. Der Gehalt war sehr gering (9 mg/l) und nahm außerdem während der letalen Phase fast vollständig wieder ab.

Stamm E: Der Serpentin- und Ajmalicingehalt nahm bei diesem Stamm nach einer lag-Phase von 6 Tagen zu. Bereits am 9. Tag der Kultivierung in der stationären Phase des Zellwachstums wurde der maximale Ajmalicingehalt (55 mg/l) gemessen. Der höchste Serpentinegehalt der Zellen konnte

erst im stationären Stadium am 16. Tag der Kultivierung festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich der Ajmalicingehalt der Zellen bereits um 50 % verringert. Auch der Serpentinegehalt nahm bis zum letzten Tag des Versuchs deutlich wieder ab. Der Tetrahydroalstonin-gehalt der Zellen war äußerst gering, nur am 9. und 10. Tag konnte eine leichte Zunahme bis 4 mg/l festgestellt werden.

Stamm F: Die zeitliche Trennung des höchsten Ajmalicin- und des höchsten Serpentinegehaltes war bei Stamm F noch deutlicher, als es bei Stamm E der Fall gewesen war. Bis zum 16. Kulturtag nahm der Serpentinegehalt der Zellen nur geringfügig zu, stieg dann in der letalen Wachstumsphase sprunghaft auf 36 mg/l an und sank bereits nach zwei Tagen wieder auf einen minimalen Wert ab. Der Ajmalicingehalt stieg nach 5tägiger lag-Phase parallel zur Zunahme der Zellmasse an und erreichte am 11. Tag seinen höchsten Wert (94 mg/l), zu einem Zeitpunkt also, an dem die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten. Im stationären Stadium erfolgte ein drastischer Abfall des Ajmalicingehaltes, der aber deutlich früher als die Zunahme des Serpentinegehaltes einsetzte. Tetrahydroalstonin konnte am 6. Tag zum ersten Mal nachgewiesen werden. Der Gehalt stieg dann bis zum 14. Tag leicht an (13 mg/l), um dann nachdem die Zellen in die letale Phase übergegangen waren, bis auf einen minimalen Wert abzufallen. Die Abnahme des Tetrahydroalstonins erfolgte vor der deutlichen Zunahme der Serpentinbildung und der maximale Gehalt an Tetrahydroalstonin wurde zeitlich zwischen dem höchsten Ajmalicingehalt und dem Zeitpunkt optimaler Serpentinbildung festgestellt.

Die Bedingungen für die Kultivierung dieser sechs Zellstämme und das Nährstoffangebot im verwendeten Medium waren bei allen Stämmen vollkommen gleich. Trotzdem

waren auch deutliche Unterschiede bei der Produktion der Zellmasse eingetreten. Bei gleicher Kulturdauer wies Stamm D mit 18 g Trockengewicht pro Liter Medium die geringste Zellmasse auf, während Stamm B in der gleichen Zeit den maximalen Gehalt dieser im Vergleich stehenden Zellstämme mit 28 g Trockengewicht pro Liter Medium erreicht hatte. Die Zellen der untersuchten Stämme haben also die Fähigkeit, die ihnen zur Verfügung stehenden Nährstoffe unterschiedlich auszunutzen und dabei Biosyntheseleistungen zu vollbringen, die ebenfalls stark variieren. Dabei hatte optimales Zellwachstum nicht unbedingt auch höchste Syntheseleistungen zur Folge. So hatte Stamm B mit der höchsten Produktion von Zellmasse (28 g/l) nur durchschnittliche Mengen von Serpentin und Ajmalicin gebildet, während Stamm A mit einem viel geringeren Wachstum (22 g/l TG) den höchsten Gehalt an Ajmalicin (143 mg/l) aufweisen konnte. Der Vermutung, daß Stamm A gerade aufgrund des geringeren Wachstums zu höheren Stoffwechselleistungen hätte fähig sein können, widersprachen die Ergebnisse, die mit Stamm D erzielt worden waren. Dieses Gewebe wies die niedrigste Zellmassenbildung (18 g/l TG) auf, trotzdem waren maximal nur 40 mg/l Ajmalicin in den Zellen enthalten.

Für die Bildung der Alkaloide während des Wachstums dieser varianten Zellstämme ließen sich drei wesentliche Charakteristika feststellen. Die Produktbildung konnte direkt mit dem Wachstum korreliert sein, wie es bei der Serpentinbildung von Gewebe des Stammes B der Fall war. Maximale Produktbildung fand dagegen bei der Ajmalicinsynthese von Stamm E nur in der exponentiellen Wachstumsphase statt, danach wurde Ajmalicin wieder abgebaut. Die dritte Möglichkeit wurde bei Gewebe von Stamm F erfaßt. Der höchste Gehalt an Serpentin konnte erst gemessen werden, als die Zellen bereits von dem

stationären Stadium in die letale Phase übergangen.

Am Beispiel von Stamm B wird deutlich, daß das Gewebe bereits am Ende der lag-Phase biosynthetisch aktiv ist, da bereits zu diesem Zeitpunkt die Bildung von Tetrahydroalstonin begann. Während die Synthese von Tetrahydroalstonin eingestellt wurde, oder was natürlich ebenso gut möglich ist, Metabolisierung von Tetrahydroalstonin stattfand, setzte während des exponentiellen Wachstums die Bildung von Serpentin und Ajmalicin ein, und sogar im letalen Stadium der Wachstumskurve waren die Zellen noch zu Stoffwechselleistungen fähig, obwohl zu diesem Zeitpunkt bereits der überwiegende Teil der Saccharose im Medium verbraucht war und Zellen abstarben. Die Kurve des Wachstums fiel im letalen Stadium deutlich ab, trotzdem blieb der Ajmalicingehalt der Zellen konstant, sie hatten also weiterhin Ajmalicin produziert.

Tetrahydroalstonin wurde von drei der hier untersuchten Stämme (B, C, E) vor dem 12. Tag der Kultivierung gebildet. Die höchsten Tetrahydroalstoningehalte wurden entweder vor dem Maximum der Ajmalicinbildung oder aber zur gleichen Zeit gemessen.

Eine Ausnahme machte Stamm F, bei dem das Maximum des Tetrahydroalstoningehaltes vier Tage nach der maximalen Ajmalicinbildung gemessen wurde. Aber auch bei diesem Stamm wurde Tetrahydroalstonin, wie es auch bei vier weiteren Stämmen der Fall war, eindeutig vor dem Einsetzen der Serpentin synthese optimal gebildet. Der sechste Stamm besaß die Fähigkeit zur Bildung von Tetrahydroalstonin nicht.

Die Produktion von Serpentin und Ajmalicin fand entweder parallel statt oder war bei zwei Stämmen (E und F)

deutlich zeitlich voneinander getrennt, wobei zuerst die Bildung von Ajmalicin auftrat. Der Biosyntheseweg des Ajmalicins konnte durch Einsatz von radioaktiv markierten Vorstufen im zellfreien System untersucht werden (STÖCKIGT, 1979). Es wird angenommen, daß Serpentin durch Dehydrierung aus Ajmalicin gebildet wird. Die zeitliche Abfolge der Bildung von Ajmalicin und Serpentin bei den Stämmen E und F könnte diese Annahme bestätigen, allerdings besteht bei Stamm F keine direkte quantitative Beziehung zwischen der Abnahme des Ajmalicins und der Zunahme des Serpentinegehaltes in diesem Gewebe. Ajmalicin wurde sicherlich metabolisiert und diente dabei vermutlich als Vorstufe für andere Alkaloide. Interessant ist in dieser Hinsicht auch der Verlauf der Alkaloidsynthese von Stamm A. Nach Erreichen des Maximums am 14. Tag der Kinetik, fiel der Ajmalicingehalt der Zellen stark ab. Wenn Serpentin aus Ajmalicin gebildet würde, sollte sich dieser starke Abbau des Ajmalicins in einer deutlichen Steigerung der Serpentin synthese bemerkbar machen. Das war hier aber nicht der Fall, der Serpentinegehalt nahm parallel zum Ajmalicingehalt ab. Die Akkumulation der gebildeten Alkaloide konnte nur in zwei Fällen beobachtet werden, bei der Serpentin synthese von Stamm C und der Bildung von Ajmalicin durch Stamm B. Bei den anderen untersuchten Stämmen erreichten die Alkaloide im Laufe der Kultivierung einen Maximalwert und nahmen danach deutlich wieder ab, obwohl diese Zellen ihre Inhaltsstoffe normalerweise nicht ausscheiden, sondern in der Vakuole deponieren (ZENK, 1978 a).

Die Abnahme des Sekundärstoffgehaltes im Gewebe einer Zellkultur kann, besonders im letalen Wachstumsstadium, durch verstärkte Zell-Lyse und der damit verbundenen Abgabe der Sekundärstoffe in das Kulturmedium erklärt werden. Bei Zellstämmen von Catharanthus roseus wurde aber mehrmals eine deutliche Abnahme des Alkaloidgehaltes be-

reits in der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt, in einem Stadium also, in dem der Anteil lysierter Zellen in der Suspension nur sehr gering gewesen sein konnte. Es ist daher anzunehmen, daß die Alkaloidabnahme, die bei den oben beschriebenen Versuchen festgestellt wurde, auf einsetzenden metabolischen Reaktionen beruhte.

Durch kinetische Untersuchungen des Zellwachstums und der Alkaloidbildung dieser sechs Zellstämme von Catharanthus roseus wird deutlich, welche Variationen bereits innerhalb einer Zellpopulation auftreten können. Die hier verwendeten Stämme waren aus Zellen einer Suspensionskultur nach Plattieren und Selektion angelegt worden. Der verwendete Ausgangsstamm hatte als Suspension ein vollkommen homogenes Erscheinungsbild gezeigt. Daß diese äußerlich so gleichen Zellen aber zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen befähigt waren, wurde erst durch Untersuchungen der daraus abgeleiteten "Tochterstämme" deutlich. Sie zeigten unter einheitlichen Kulturbedingungen deutliche Variationen im Wachstum, in der Menge der gebildeten Inhaltsstoffe und im zeitlichen Ablauf ihrer Alkaloidsynthesen. Gerade die unterschiedlichen Zeitpunkte der maximalen Alkaloidgehalte erfordern kinetische Untersuchungen, soll bei der Kultivierung pflanzlicher Zellen eine gute Ausbeute der gebildeten Inhaltsstoffe erzielt werden. Aufarbeitung des Gewebes zu einem ungünstigen Zeitpunkt könnte die Erfolgsaussichten sehr verringern und zu einem falschen Bild der biosynthetischen Leistungsfähigkeit des verwendeten Stammes führen. Wäre zum Beispiel Gewebe von Stamm F nach 15tägiger Kultivierung geerntet worden, hätte man nur einen geringen Gehalt an Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin feststellen können, die sehr gute Fähigkeit zur Ajmalicinbildung hätte dabei aber gar nicht erfaßt werden können, da die Zellen bereits am 11. Tag ihren höchsten Ajmalicingehalt erreicht

hatten, der aber am 15. Tag schon wieder drastisch abgenommen hatte. Gerade in Hinblick auf die biotechnologische Nutzung pflanzlicher Zellen zur Produktion von Naturstoffen sind optimale Produktausbeuten notwendig. Daher erscheint die kinetische Charakterisierung der Bildung von Inhaltsstoffen durch die verwendeten Zellstämme besonders wichtig, da die Produktbildung, wie an den oben genannten Beispielen gezeigt werden konnte, selbst innerhalb einer Population von Zellen extreme Unterschiede aufweisen kann.

3.2. Wachstum, Produktbildung, Enzymaktivitäten und Mediumzusammensetzung während der Kultivierung eines ausgewählten Stammes von Catharanthus roseus

In einer statischen Kultur kann die biosynthetische Aktivität der Zellen stark mit dem Angebot von Nährstoffen variieren. So konnte an Suspensionskulturen von Morinda citrifolia beobachtet werden, daß die Anthrachinonsynthese erst dann deutlich gefördert wurde, als die Saccharose des Mediums verbraucht war und dadurch die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen verzögert wurde (SCHULTE, 1978).

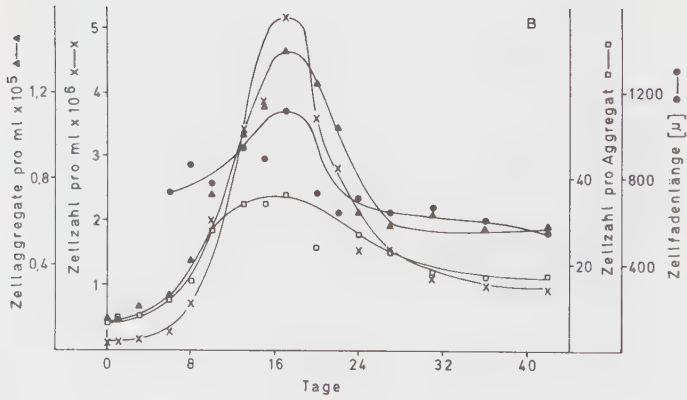
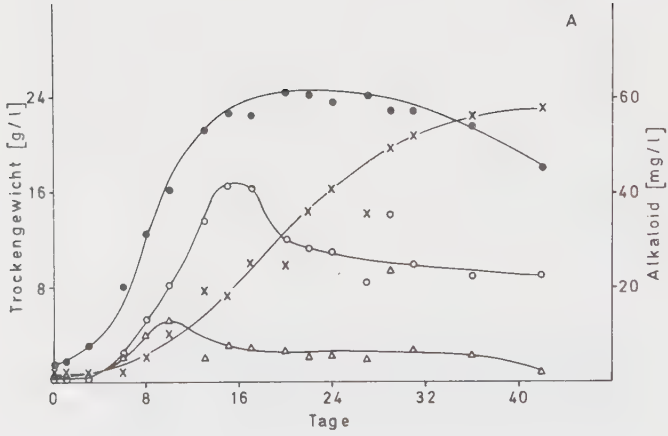
Die Bedingungen, die die Zellen im Kulturmedium vorfinden, ändern sich durch Verbrauch der Kohlenstoffquelle und der Mineralsalze stetig. Ebenso können sich Änderungen im pH-Wert und der Leitfähigkeit auf Wachstum und Produktbildung der Zellen auswirken. Besonders Abweichung des pH-Wertes kann die für die Biosynthese der Inhaltsstoffe notwendigen Enzyme positiv oder negativ beeinflussen, Effekte also, die sich im Sekundärstoffgehalt der untersuchten Zellen widerspiegeln.

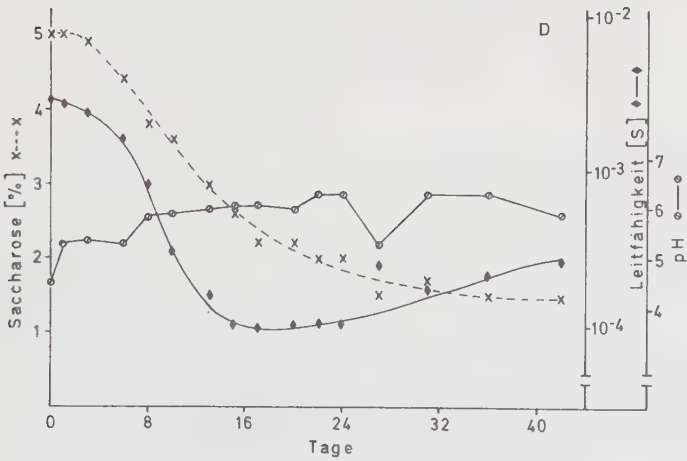
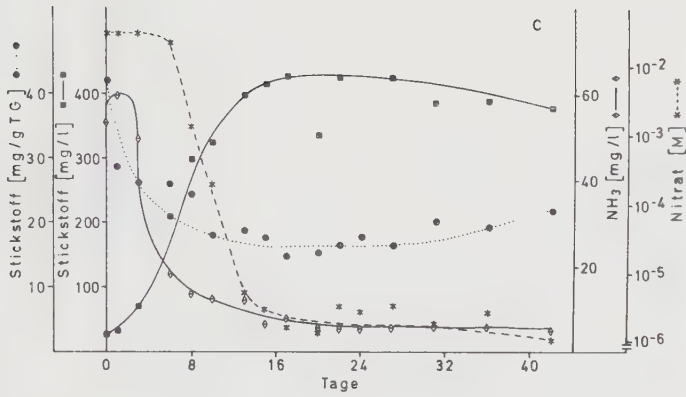
Das zeitlich begrenzte Auftreten spezieller Enzymaktivitäten innerhalb des Kulturzyklus einer Zellkultur ist besonders zum Studium regulatorischer Aspekte interessant. So sind beispielsweise Zellsuspensionskulturen von Petroselinum hortense als Modellsystem zur Untersuchung der enzymatischen Regulation der Flavonoidbiosynthese verwendet worden (HAHLBROCK und GRIESEBACH, 1979). Die Bildung von Flavonen und Flavonolglykosiden in diesen Zellen hing dabei von der Induktion der Enzyme ab, die an ihrer Synthese beteiligt waren. Diese Enzyme ließen sich in zwei Gruppen einteilen, deren Aktivitäten nach Bestrahlung mit UV-Licht simultan anstiegen. Die Enzyme der Gruppe I erreichten ihre höchste Aktivität einige Stunden früher als diejenigen der Gruppe II. Zur genauen Charakterisierung von Enzymen, die an Stoffwechselwegen zur Bildung von Sekundärstoffen beteiligt sind, ist es günstig, den Zeitpunkt ihrer maximalen Aktivität zu erfassen. Kinetische Untersuchungen der Aktivität an der Biosynthese der Inhaltsstoffe beteiligter Enzyme und der Vergleich mit dem Wachstum und der Produktion der Zellen im Verlauf der Kultivierung sind daher wichtig, um einen Einblick in die biosynthetische Leistungsfähigkeit einer Zellkultur zu bekommen. Zum Studium dieser Kriterien wurde ein Stamm (LS 40) von Catharanthus roseus ausgewählt, der zuvor aus einer Population plattierter Zellen selektiert worden war. Das Gewebe wurde in 400 ml Produktionsmedium in 1 l Erlenmeyerkolben im Dunkeln bei 30° C kultiviert. Das Inoculum (feuchte Zellmasse) betrug 20 cm³ Gewebe pro 400 ml Medium. Das Gewebe der Vorkultur war in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit 2500 ml Wachstumsmedium bei 30° C herangezogen worden. Über einen Zeitraum von 41 Tagen wurde in 1 - 3tägigem Abstand das Gewebe eines Kolbens geerntet und zur Analyse der Inhaltsstoffe und der Enzymaktivitäten, wie in Kapitel II beschrieben, aufgearbeitet. Das von den Zellen abfiltrierte Medium wurde

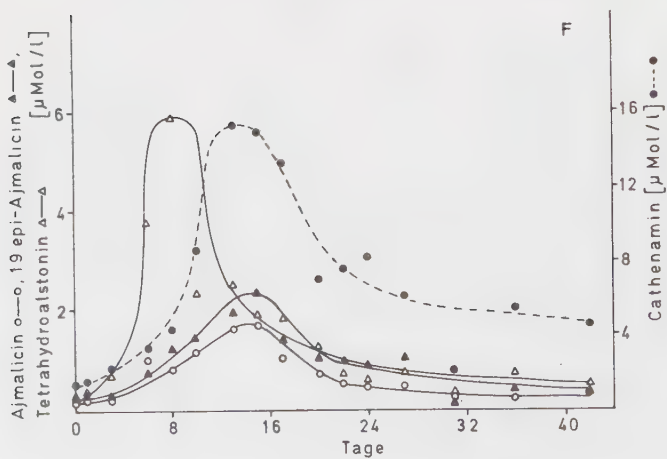
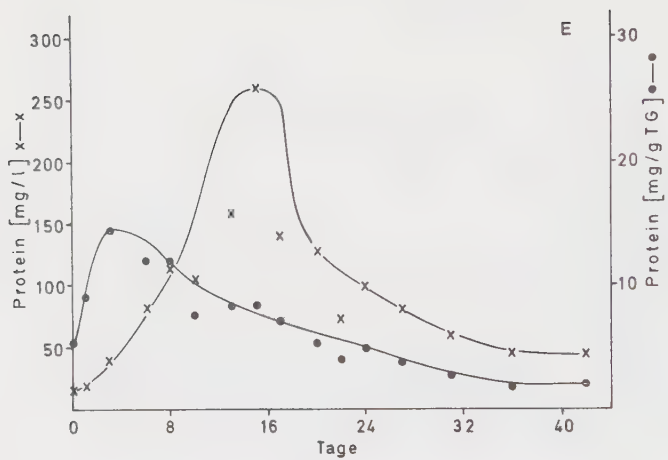
ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 (A - G) zusammenfassend dargestellt.

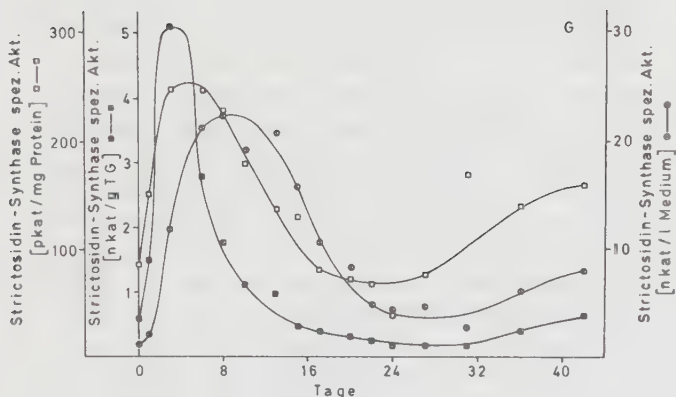
Abb. 7: Die Untersuchung von Wachstum, Produktbildung, Enzymaktivitäten und Mediumzusammensetzung während der Kultivierung eines Stammes von Catharanthus roseus.

- A: Die Änderung des Trockengewichtes (●—●), des Serpentin- (x - x), Ajmalicin- (○—○) und des Tetrahydroalstoningehaltes (Δ - Δ) während der Kultivierung.
- B: Die Änderungen der Anzahl der Zellen, Zellaggregate, Zellen pro Aggregat und der Zellfadenlänge.
- C: Der Stickstoffgehalt des Gewebes, der NH_3 - und Nitratgehalt des Mediums im Laufe der Kultivierung.
- D: Die Änderung des Saccharosegehaltes, der Leitfähigkeit und des pH-Wertes im Medium.
- E: Die Änderung des Proteingehaltes des Gewebes.
- F: Die Enzymaktivitäten zur Bildung des Cathenamin und der Indolalkaloide im zellfreien System.
- G: Die spezifische Aktivität der Strictosidin-Synthase während der Kultivierung.









3.2.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung

Abbildung 7 A gibt den Verlauf der Wachstumskurve und der Bildung der Inhaltsstoffe wieder. Es wurde die zeitabhängige Bildung von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin untersucht. Bereits nach einem Tag konnte eine leichte Zunahme der Zellmasse festgestellt werden, die lag-Phase war also beim Wachstum des verwendeten Stammes nur sehr kurz. In der darauffolgenden 12tägigen exponentiellen Phase nahm das Trockengewicht bis auf 22 g/l Medium zu, um dann in der verhältnismäßig langen stationären Phase von etwa 14 Tagen annähernd konstant zu bleiben. Erst am 30. Tag der Kinetik erreich-

ten die Zellen die letale Wachstumsphase, die durch deutliche Abnahme des Trockengewichtes gekennzeichnet war. Die Synthesen von Tetrahydroalstonin und Ajmalicin setzten parallel zueinander am 6. Tag der Kultivierung ein. Tetrahydroalstonin erreicht bereits am 10. Tag seinen Maximalwert (11,5 mg/l), bis zum 16. Tag folgte dann wieder eine deutliche Abnahme des Gehaltes in den Zellen bis auf 6 mg/l, aber während der anschließenden stationären Phase des Zellwachstums blieb dieser Wert annähernd konstant. Der Ajmalicingehalt der Zellen nahm bis zum Erreichen eines Maximums am 15. Tag deutlich zu (41 mg/l). Beim Übergang der Zellen in die stationäre Phase wurde Ajmalicin zuerst stark und später bis zum Erreichen des letalen Zellstadiums kaum noch abgebaut. Eine deutliche Zunahme des Serpentinegehaltes konnte erst am 8. Kulturtag gemessen werden. Danach erfolgte während der exponentiellen und stationären Phase eine kontinuierliche Serpentinbildung, die sich sogar noch fortsetzte, als sich die Zellen bereits im letalen Stadium befanden. Der höchste Serpentinegehalt (58 mg/l) wurde am letzten Tag des Versuches gemessen. Auch bei diesem Zellstamm von Catharanthus roseus erreichte Tetrahydroalstonin während des Wachstumszyklus zuerst sein Maximum, danach folgte der Ajmalicingehalt. Während der Gehalt von Ajmalicin nach dem 22. Tag in der stationären Phase konstant blieb, wurde kontinuierlich Serpentin gebildet und in den Zellen akkumuliert.

Die Anzahl der Zellen und Zellaggregate pro ml Medium und die Zahl der Zellen in den Aggregaten selbst (Abb. 7 B) nahm der Wachstumskurve folgend nach 2tägiger lag-Phase deutlich zu. Beim Eintreten der Zellen in das stationäre Stadium nahmen diese drei Parameter aber sofort drastisch ab, obwohl das gemessene Trockengewicht des Gewebes während dieser Phase noch konstant blieb. Eine Er-

klärung hierfür wäre die Tatsache, daß beim Bestimmen der Zellzahlen nur intakte Zellen ausgezählt wurden, während bei der Bestimmung des Trockengewichtes auch die in der stationären Phase schon vermehrt vorhandenen Zelltrümmer der lysierten Zellen mit erfaßt wurden.

Die Länge der Zellfäden nahm ebenfalls während des exponentiellen Zellwachstums deutlich von 750 μ bis 1100 μ zu, nach Erreichen des maximalen Wertes zu Beginn der stationären Phase wurden die Zellfäden bis zum Einsetzen der letalen Phase durch beginnendes Absterben von Zellen wieder bis auf 550 μ verkürzt.

In Abbildung 7 C ist die Änderung des Gesamtstickstoffgehaltes der Zellen während der Kultivierung dargestellt. Mit zunehmender Zellmasse (vgl. Abb. 7 A) stieg auch der Gesamtstickstoffgehalt (mg/l) an. Wurde der Gesamtstickstoffgehalt auf das Trockengewicht bezogen, nahmen die erhaltenen Werte während der lag-Phase zuerst ab. Bereits nach drei Tagen hatten sich Zunahme des Trockengewichtes und des Gesamtstickstoffgehaltes angeglichen, so daß die gemessenen Werte bis zu einem leichten Anstieg in der letalen Wachstumsphase konstant blieben.

3.2.2. Charakterisierung des Kulturmediums

Veränderungen der Mediumzusammensetzung im Kulturzyklus einer Zellkultur können ihre Stoffwechselleistungen beeinflussen. Kontinuierliches Messen z.B. des Nitrat- oder Saccharosegehaltes im Medium können daher Anhaltspunkte für das Auftreten spezifischer Stoffwechselaktivitäten in den Zellen von Catharanthus roseus geben.

Der Nitratgehalt im Medium (Abb. 7 C) blieb bis zum 6. Kulturtag fast konstant, nahm danach aber bis zum 17. Tag bis auf 0,01 % der ursprünglich eingesetzten Menge ab. Gleichzeitig mit diesem deutlichen Abfall des Nitratgehaltes während der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen, konnte am 6. Kulturtag die erste deutliche Zunahme der Sekundärstoffbildung (Ajmalicin, Tetrahydroalstonin) gemessen werden. Vom 17. Tag an, nachdem die Zellen ihr stationäres Stadium erreicht hatten, blieb der Nitratgehalt im Medium konstant niedrig, sank aber nicht auf den Wert 0 ab.

Der NH_3 -Gehalt des Mediums wurde bereits nach dem ersten Kulturtag stark reduziert. Ebenso wie Nitrat wurde NH_3 nur während der exponentiellen Phase verbraucht. Als sich stationäres Wachstum eingestellt hatte, blieb der NH_3 -Gehalt bis zum Ende der Kultivierung konstant. Während der stationären Phase wurde also entweder kein NH_3 mehr verbraucht oder es hatte sich möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen NH_3 -Verbrauch und NH_3 -Ausscheidung der Zellen eingestellt.

Vergleicht man Wachstum und Alkaloidbildung mit dem Gehalt von NH_3 und Nitrat im Medium wird deutlich, daß diese stickstoffhaltigen Verbindungen bevorzugt in der Phase maximalen Zellwachstums von dem Gewebe aufgenommen wurden. In der stationären Phase, in der Absterben und Wachstum der Zellen im Gleichgewicht stehen, werden weder Nitrat noch NH_3 aus dem Medium verbraucht.

Der Saccharoseverbrauch aus dem Medium (Abb. 7 D) setzte sofort nach eintägiger lag-Phase ein. Während des logarithmischen Wachstums konnte schnelle Saccharoseaufnahme aus dem Medium beobachtet werden, während nach Erreichen des stationären Wachstums nur noch deutlich verlangsamte Aufnahme dieser Kohlenstoffverbindung fest-

zustellen war. Bis zum letzten Tag der Kultivierung war der Saccharosegehalt von anfänglich 5 % auf 1,5 % abgesunken, die angebotene Saccharose wurde also nicht vollständig von den Zellen verbraucht.

Die exponentielle Wachstumsphase war durch eine drastische Abnahme der Leitfähigkeit des Mediums charakterisiert, die annähernd mit dem Verbrauch des Nitrates parallel verlief und der Wachstumskurve umgekehrt proportional war. Die gleiche Beobachtung hatten HAHNBROCK und Mitarbeiter (1974) an Suspensionskulturen von Glycine max gemacht. Aufgrund der Zusammensetzung des dabei verwendeten Mediums wurden die beobachteten Änderungen der Leitfähigkeit in erster Linie auf den Verbrauch von Nitrationen zurückgeführt.

Der pH-Wert des untersuchten Mediums war direkt nach Zugabe der Zellen abgesunken. Bereits nach 1tägiger Kultivierung wurde dann eine Zunahme des pH-Wertes über den vor dem Autoklavieren eingestellten pH-Wert hinaus festgestellt. Während der exponentiellen und stationären Phase des Zellwachstums nahm der pH-Wert dann weiterhin allmählich zu. Obwohl bereits in der stationären Phase Autolyse der Zellen eingesetzt hatte, wurde kein Abfallen des pH-Wertes festgestellt.

3.2.3. Kinetische Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten im Zellmaterial

Die Bildung der Indolalkaloide in Zellen von Catharanthus roseus setzt einen sehr komplexen Biosyntheseweg voraus, der über mehrere Zwischenprodukte verläuft und dessen Schritte von hochspezifisch wirksamen Enzymen katalysiert werden. Die Bildung von Strictosidin aus den Vorstufen Tryptamin und Secologanin leitet die Synthese der Indol-

alkaloide ein und wird durch das Enzym Strictosidin-Synthase katalysiert (TREIMER und ZENK, 1979 b). Strictosidin wird in mehreren Reaktionsschritten zu Cathenamin umgewandelt, das mit Hilfe der NADPH-abhängigen Cathenamin-Reduktase im zellfreien System zur Bildung der drei Isomere Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin umgesetzt wird. Wurde dem Reaktionsansatz kein reduzierter Cofaktor (NADPH, NADH) zugesetzt, wird Cathenamin akkumuliert (STÖCKIGT, 1979).

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit von Enzymaktivitäten im Zellmaterial wurde die Strictosidin-Synthase und die enzymatische Bildung von Cathenamin, Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin getestet. Um die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmen zu können, wurde der Proteingehalt des Gewebes ermittelt.

Der Proteingehalt (Abbildung 7 E) stieg in der exponentiellen Wachstumsphase entsprechend der Zunahme des Trockengewichtes drastisch an, erreichte beim Übergang zum stationären Wachstum am 15. Tag seinen Maximalwert und sank in der sich anschließenden stationären Phase wieder deutlich bis zum Ende der Kultivierung ab.

Die spezifische Aktivität der Strictosidin-Synthase (nkat/l Medium) (Abbildung 7 G) stieg bereits nach dem ersten Tag der Kultivierung steil bis zu einem maximalen Wert am 8. Tag an. An diesem Tag konnte die erste deutliche Zunahme eines der Produkte des Stoffwechselweges (Tetrahydroalstonin) gemessen werden. Die Enzymaktivität blieb bis zum 15. Tag im Maximum und nahm danach im weiteren Verlauf der Kultivierung deutlich ab. Die Produktbildung der Zellen trat zeitlich verzögert nach dem Maximum der Strictosidin-Synthase Aktivität auf. Tetrahydroalstonin wurde maximal am 10. Tag nachgewiesen, wäh-

rend der höchste Ajmalicingehalt erst am 15. Tag der Kultivierung gemessen wurde, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Enzymaktivität für die Strictosidinbildung bereits deutlich reduziert war. Am 24. Tag hatte die spezifische Aktivität der Strictosidin-Synthase einen Minimalwert erreicht. Zu diesem Zeitpunkt nahm der Ajmalicin- und der Tetrahydroalstoningehalt der Zellen wieder ab, während der Serpentinegehalt anhaltend zunahm. Offensichtlich waren bereits ausreichend Vorstufen für die Serpentinbildung bereitgestellt worden, so daß trotz verminderter spezifischer Aktivität der Strictosidin-Synthase (nkat/l Medium) weiterhin Serpentin gebildet werden konnte.

Bei der Inkubation zellfreier Extrakte aus Suspensionskulturen von Catharanthus roseus mit den biogenetischen Vorstufen Tryptamin und Secologanin werden die Indolalkaloide Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin gebildet (STÖCKIGT et al., 1976). Dabei ist die Zugabe reduzierter Cofaktoren, wie NADPH oder NADH, unbedingt notwendig. Bei Fehlen von NADPH (NADH) im Reaktionsansatz akkumuliert die Vorstufe der Ajmalicin-Isomere, das Cathenamin (STÖCKIGT, 1979).

Die enzymatischen Aktivitäten zur Bildung des Cathenamin und der Ajmalicin-Isomere in zellfreien Systemen aus Gewebe des hier verwendeten Stammes von Catharanthus roseus wurden in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht. Dabei diente die im Reaktionsansatz gebildete Produktmenge als Maß für die untersuchten Enzymaktivitäten. In Abbildung 7 F sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Die Angaben der gebildeten Produkte beziehen sich dabei auf zellfreie Extrakte, die von Zellen aus einem Liter Suspensionskultur gewonnen wurden.

Die höchste Enzymaktivität zur Bildung von Cathenamin wurde in Extrakten aus 13 Tage alten Zellen festgestellt, zu einem Zeitpunkt also, an dem auch die spezifische Aktivität der Strictosidin-Synthase (mg/l) (vgl. Abbildung 7 G) maximal war.

In Abhängigkeit vom Alter des aufgeschlossenen Zellmaterials variierte das Verhältnis der im zellfreien System gebildeten Mengen an Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin. Von zellfreien Präparationen aus 8 Tage alten Zellen wurde überwiegend Tetrahydroalstonin gebildet, wurden dagegen 17 Tage alte Zellen aufgeschlossen, so konnte annähernd gleiche Bildung der Ajmalicin-Isomere gemessen werden. Die Bildung von Ajmalicin war im zellfreien System am 17. Tag optimal, zu diesem Zeitpunkt wurde der höchste Ajmalicingehalt der Zellen festgestellt. Zwei Tage nachdem im zellfreien System die höchste Bildung von Tetrahydroalstonin gemessen worden war, wurde maximale Akkumulation von Tetrahydroalstonin in den Zellen selbst verzeichnet. Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die Enzymaktivitäten für die Bildung von Zwischenstufen und Endprodukten des Indolalkaloidbiosyntheseweges nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Laufe der Kultivierung einer Zellkultur auftreten. Die Zeitpunkte der maximalen Enzymaktivitäten sind streng miteinander koordiniert. Interessant ist die zeitliche Trennung der höchsten Tetrahydroalstonin- und Ajmalicinbildung im zellfreien System. Es muß ein regulatorisches Prinzip vorhanden sein, das in Abhängigkeit von dem Alter der Zellkultur die enzymatischen Aktivitäten zur Bildung der Ajmalicin-Isomere kontrolliert und daher für die zeitabhängige Akkumulation der Inhaltsstoffe in den Zellen verantwortlich ist.

Bei ihren Untersuchungen an Sojazellen fanden HAHLBROCK und Mitarbeiter (1974), daß die Zeit maximaler Phenylalanin Ammoniumlyase Aktivität mit dem Verbrauch von stickstoffhaltigen Nährstoffen im Medium zusammentraf. Sie vermuteten daher, daß der Nährstoffmangel zur Umstellung des Zellstoffwechsels auf die Synthese von Inhaltsstoffen geführt hatte.

Bei Suspensionskulturen von Catharanthus roseus nahm die Aktivität der Strictosidin-Synthase schon zu Beginn der Kultivierung deutlich zu. Diese Zunahme der Enzymaktivität konnte nicht durch veränderte Bedingungen im Medium ausgelöst worden sein, da zu diesem Zeitpunkt noch keine drastischen Änderungen, sei es von pH-Wert, Leitfähigkeit oder Saccharosegehalt, festgestellt worden waren. Die Zeitpunkte der maximalen Enzymaktivitäten für die Bildung der Indolalkaloide lassen sich mit der Änderung der Leitfähigkeit des Mediums in Beziehung setzen. Die höchste Aktivität zur Bildung von Tetrahydroalstonin traf mit dem Zeitpunkt zusammen, an dem gerade eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit festzustellen war. Die maximale Enzymaktivitäten zur Synthese von Cathenamin, Ajmalicin und 19epi-Ajmalicin konnten erst gemessen werden, nachdem die Abnahme der Leitfähigkeit festgestellt worden war. Durch Messen der Leitfähigkeit des Mediums während der Kultivierung könnte so der günstigste Zeitpunkt zum Ernten der Zellen erfaßt werden, wenn man Gewebe gewinnen will, das sich durch hohe Aktivität des gewünschten Enzyms auszeichnet. Diese Methode konnte bereits erfolgreich an Kulturen von Glycine max angewendet werden, um die spezifischen Stadien ihres Wachstums zu charakterisieren und so Zellen mit hoher Enzymaktivität für die Flavonoidsynthese zu gewinnen (HAHLBROCK et al., 1974).

Das Studium des zeitlichen Auftretens von Enzymaktivitäten und den Produkten der von ihnen katalysierten Reaktionen gibt einen Eindruck von den vielfältigen metabolischen und regulatorischen Leistungen einer Zellkultur. Die maximalen Enzymaktivitäten beschränken sich auf einen kurzen Zeitraum und sind in ihrer Abfolge streng untereinander koordiniert. Diese Zeitpunkte genau zu erfassen und sie mit der Anreicherung ihrer Produkte in Beziehung zu setzen, sind notwendige Voraussetzungen zur Aufklärung von Biosynthesewegen und deren Regulation.

Die enzymatischen Untersuchungen wurden unter Mitarbeit von Frau Dr. M. Rüffer und Herrn Dr. J. F. Treimer (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Ihnen sei an dieser Stelle für die Zusammenarbeit gedankt.

4. Einflüsse applizierter Substanzen auf die Stoffwechselleistungen von Catharanthus-Zellkulturen

Die Kenntnisse über die Biosynthesewege pflanzlicher Inhaltsstoffe ermöglichen es, spezifische Zwischenstufen an kultivierte Zellen zu applizieren um so zu versuchen, die Syntheseleistungen der Zellen für die Bildung ihrer Inhaltsstoffe zu erhöhen. Für derartige Versuche müssen folgende wesentliche Voraussetzungen erfüllt werden. Die Zellen müssen die Enzyme zur Umwandlung der angebotenen Vorstufe in ihre Produkte besitzen. Die Zellen müssen die Vorstufe aufnehmen können und dürfen nicht durch sie geschädigt werden. Das gebildete Produkt darf nicht wieder vollständig metabolisiert werden (nach STECK und CONSTABEL, 1974).

Daß es gelingt, durch Zugabe von Vorstufen die Produktbildung kultivierter Zellen wesentlich zu erhöhen, konnte bereits an Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten bewiesen werden. o-Succinylbenzoesäure ist ein zentrales Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Anthrachinonen in Zellsuspensionskulturen von Morinda citrifolia (LEISTNER, 1975). Wurde diese Verbindung zu Suspensionskulturen von Morinda citrifolia zugesetzt, konnte nach einer Inkubationszeit von 20 Tagen eine um 100 % gesteigerte Anthrachinonbildung gegenüber der normalen Kultur gemessen werden (ZENK et al., 1975). Dieser Effekt konnte auch bei Kulturen anderer Rubiaceae-Arten beobachtet werden, allerdings waren hier die Anthrachinongehalte nur maximal um 50 % gesteigert worden (SCHULTE, 1978). An Kulturen von Morinda citrifolia konnte eine Förderung der Produktbildung durch OSB nur dann festgestellt werden, wenn die Zellkultur selbst schon in der Lage war, Anthrachinone zu produzieren. In Kulturen, in denen die Farbstoffbildung durch Zugabe von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure unterdrückt war, wurde auch nach Zugabe von OSB keine Anthrachinonbildung induziert, da offensichtlich die zur Synthese nötigen Enzyme unter diesen Kulturbedingungen reprimiert sind. Wurde radioaktiv markierte OSB an Zellen appliziert, die in dem für die Anthrachinonbildung optimalen B5-NAA Medium wuchsen, ließen sich 65 % der eingesetzten Aktivität in den Produkten nachweisen (SCHULTE, 1978). Dieses Ergebnis zeigte, daß die metabolischen Leistungsfähigkeiten der Zellen durch die intern vorhandene Vorstufe noch nicht erschöpft waren, so daß durch externe Zugabe des Metaboliten eine deutliche Steigerung der Produktbildung in der Zellkultur erzielt werden konnte.

Daß sich der Gehalt an intern vorhandener Vorstufe auf die Höhe der Produktbildung auswirkt, konnte auch für die Indolalkaloidbiosynthese in Zellkulturen von Catharanthus roseus gezeigt werden (Kapitel 1.1. dieser Arbeit). Die Höhe der Alkaloidbildung in Zellkolonien von Catharanthus roseus war mit dem Gehalt an zur Verfügung stehender Vorstufe (Secologanin) korreliert. Bei Zellkolonien mit niedrigem Secologaningehalt waren auch die Alkaloidgehalte niedrig, die metabolische Bildung der Vorstufe hatte also auch hier limitierend auf den Gehalt der Endprodukte in den Zellen gewirkt.

Der Sekundärstoffgehalt einer Zellkultur wird wesentlich durch die dem Medium zugesetzten Hormone gesteuert. So konnte z.B. an Kalluskulturen von Nicotiana tabacum ein deutlicher Anstieg der Nikotinbildung verzeichnet werden, nachdem Zellen von einem Kinetin- und Indol-essigsäure-haltigen Medium auf Medium ohne Indolessigsäure übertragen worden waren (TABATA et al., 1971). Durch Zugabe von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure wurde die Nikotinbildung dieser Zellen vollständig unterdrückt.

Einen fördernden Effekt hatte 2,4 D auf die Anthocyanbildung in Kalluskulturen von Daucus carota. Ein anthocyanhaltiger Stamm war neben der durch Belichtung induzierten Bildung auch im Dunkeln zur Anthocyan-synthese fähig, wenn dem Medium 2,4 D oder andere Auxine zugesetzt worden waren (ALFERMANN und REINHARD, 1971).

Pflanzliche Hormone spielen also eine wesentliche Rolle bei der Induktion oder Repression von Stoffwechselwegen, die zur Bildung von Inhaltsstoffen kultivierter Zellen führen. Interessant wäre in dieser Hinsicht, ihre Wirkung auf die Bereitstellung von Stoffwechselmetaboliten für die Sekundärstoffbildung zu erfassen, um sie mit den unter diesen Bedingungen in den Zellen angereicherten Produkten in Beziehung zu setzen.

4.1. Variation im Alkaloidgehalt von Catharanthus roseus Kulturen nach Zugabe verschieden substituierter Phenoxyessigsäuren

Zur Untersuchung der Wirkung von Effektoren auf die Bildung von Indolalkaloiden und deren Vorstufen wurden Suspensionskulturen eines zuvor selektierten Stammes von Catharanthus roseus mit verschieden substituierten Phenoxyessigsäuren inkubiert. Für diese Versuche wurde das Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) ohne Zusatz von Hormonen zugrunde gelegt. Die zu testenden Effektoren wurden in Äthanol gelöst und vor dem Autoklavieren bis zu einer Konzentration von 2 mg/l zum Medium dazugegeben. Da bei diesen Untersuchungen auch der Einfluß der verschieden substituierten Phenoxyessigsäuren auf die Aktivität der Strictosidin-Synthase getestet werden sollte (vgl. Diplomarbeit U. SEIPEL, 1979), wurde das Gewebe bereits nach 7tägiger Kultivierung geerntet, um so den Zeitpunkt maximaler Enzymaktivität erfassen zu können. Von den unter dem Einfluß der verschiedenen Effektoren gewachsenen Zellen wurden alkoholische Extrakte hergestellt, deren Gehalte an Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin analysiert wurden. Als Vorstufe wurde dabei auch der Loganin/Secologaningehalt mit dem Radioimmunoassay bestimmt. Einen Überblick über die Ergebnisse und einen Vergleich der Effektorenwirkung auf den Gehalt an Vorstufe und den der Produkte geben die Abbildungen 8 - 11. Als Kontrolle waren Zellen in Medium ohne Zugabe von Hormonen gewachsen. Der Alkaloidgehalt der Zellen war sehr gering, obwohl auch unter diesen Bedingungen bereits eine deutliche Bildung von Loganin/Secologanin zu verzeichnen war (Abbildung 8). Durch Zugabe von substituierter Phenoxyessigsäure konnte der Vorstufengehalt der Zellen weiter gesteigert werden. Unter diesen Bedingungen war die Bildung der Indolalkaloide um das 8fache der Kontrolle ohne Hormone gefördert

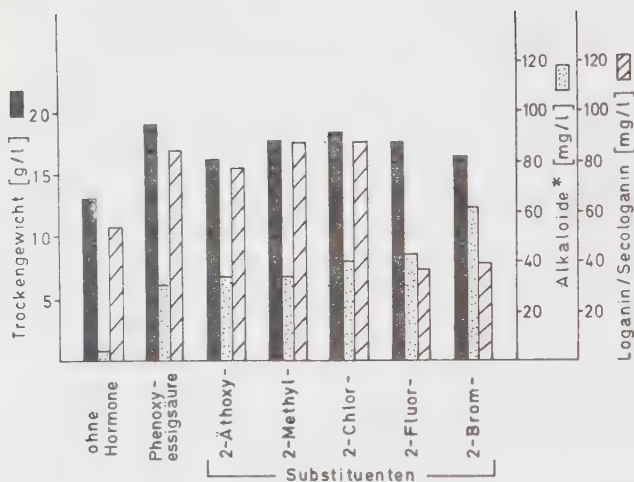
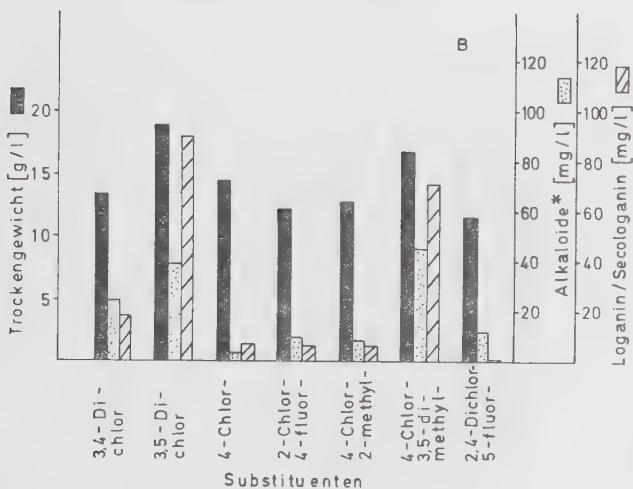
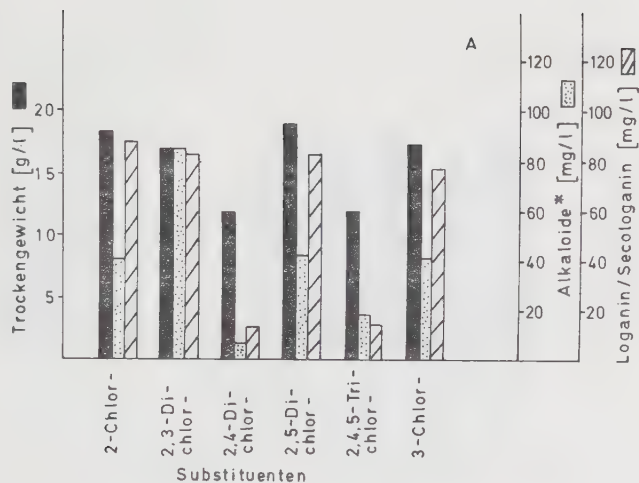
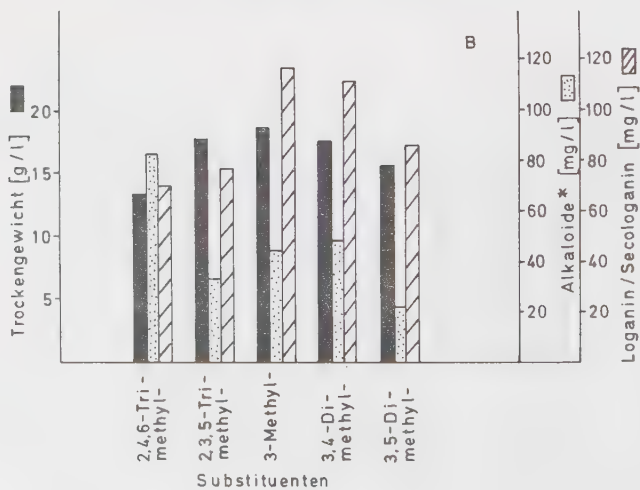
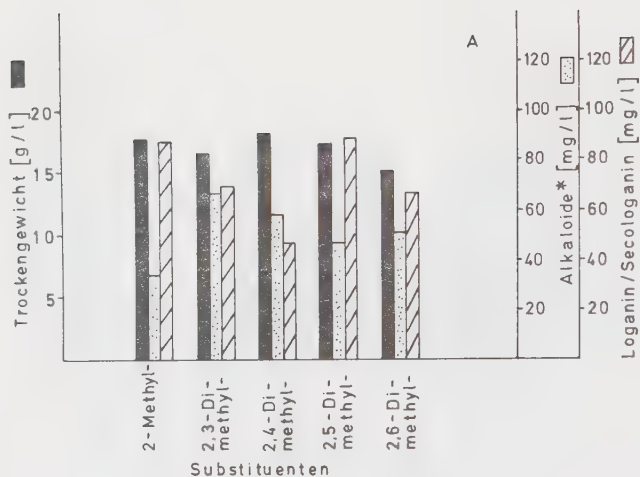
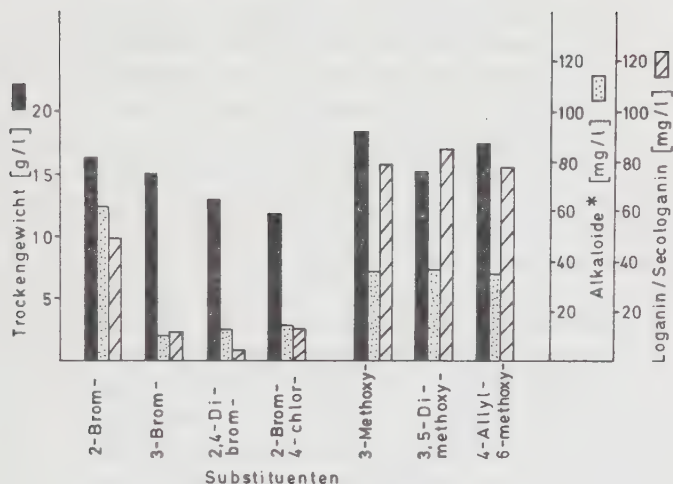


Abb. 8 - 11: Wachstum, Alkaloid- und Loganin/Secologaningehalte eines Stammes von *Catharanthus roseus*, der als Suspensionskulturen unter dem Einfluß verschieden substituierter Phenoxyessigsäuren 7 Tage kultiviert worden war.

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin







worden und auch das Wachstum der Zellen war durch Zugabe von Phenoxyessigsäure positiv beeinflusst worden. Durch Substitution der Phenoxyessigsäure ließen sich Vorstufen- und Produktgehalte eindeutig beeinflussen, wobei die Art und die Position der Substitution von entscheidender Bedeutung waren. Das Wachstum der Zellen unterlag dabei wesentlich geringeren Schwankungen. Auffallend war die starke hemmende Wirkung von Phenoxyessigsäuren, die in para-Stellung mit Halogenatomen substituiert waren. Die Bildung der Vorstufe und damit auch die Akkumulation der Indolalkaloide wurden um mehr als 80 % unterdrückt. Halogenierung der Phenoxyessigsäure in anderen Positionen konnte dagegen einen durchaus positiven Effekt ausüben, so konnte durch 2,3-Dichlorphenoxyessigsäure (Abbildung 9 A) bei gleichbleibendem Gehalt an Vorstufe die Bildung

der Alkaloide um annähernd das 3fache gesteigert werden. Die Art des Substituenten bei gleicher Position hatte auch einen deutlichen Einfluß auf die Akkumulation von Metabolit und Inhaltsstoffen (Abbildung 8). Während die Loganin/Secologaningehalte durch Äthoxy-, Methyl- oder Chlor-Substitution in Position 2 kaum verändert wurden, hatten 2-Fluor- und 2-Brom-phenoxyessigsäure den Vorstufengehalt absinken lassen. Bei der bromsubstituierten Phenoxyessigsäure beruhte der verminderte Vorstufengehalt offensichtlich auf der deutlich geförderten Alkaloidsynthese. Nur bei Brom-Substitution in Position 2 konnte dieser positive Effekt auf die Alkaloidbildung beobachtet werden. Phenoxyessigsäuren, die in anderen Stellungen einfach oder doppelt brom-substituiert waren, hemmten die Bildung der Vorstufe und parallel dazu auch die Akkumulation der Alkaloide (Abbildung 11). Anders verhielten sich Phenoxyessigsäuren, die in verschiedenen Positionen mit Chloratomen versehen waren. Deutliche Förderung der Produktbildung trat besonders bei Verbindungen auf, die in Position 3 chloriert waren. Dabei konnte sogar die hemmende Wirkung des Halogenatoms in Position 4 bei der 3,4-Dichlorphenoxyessigsäure annähernd aufgehoben werden. Deutliche Förderung der Alkaloidsynthese hatte bei allen chlorierten Verbindungen nie eine drastische Abnahme der Vorstufe zu Folge. Der Vorstufengehalt blieb also entweder konstant oder war im Vergleich zur Wirkung der nicht substituierten Phenoxyessigsäure leicht erhöht. Die hier verwendeten Effektoren hatten offensichtlich auch auf die Bereitstellung der Vorstufe Loganin/Secologanin einen positiven Einfluß ausgeübt. Der Metabolit stand der Alkaloidsynthese in größerem Umfang zur Verfügung, so daß die Zellen in der Lage waren, vermehrt Produkte zu akkumulieren.

Sehr deutlich wird dieser Effekt auch bei Phenoxyessigsäuren, die mit Methylgruppen substituiert worden waren. Methylierte Phenoxyessigsäuren übten allgemein einen positiven Effekt auf die Bereitstellung der Vorstufe und auch auf die Akkumulation der Indolalkaloide aus (Abbildung 10 A und B). 3-Methyl- und 3,4-Dimethylphenoxyessigsäure hatten unter allen getesteten Verbindungen die deutlichste Erhöhung des Vorstufengehaltes bewirkt, und als Folge davon war auch die Bildung der Alkaloide angestiegen. Höchste Bildung der Alkaloide wurde durch die in Position 2, 4, 6 dreifach methylierte Phenoxyessigsäure herbeigeführt. Dabei zeigte sich wiederum deutliche Abhängigkeit von den Positionen, die die Methylgruppen im Molekül besetzten. Methylierung in Positionen 2, 3, 5 hatte gar keinen Effekt auf die Bildung der Inhaltsstoffe gehabt. Die fördernde Wirkung der Methylgruppensubstitution sowohl auf die Bildung der Vorstufe als auch auf die Höhe der enthaltenen Alkaloide wurde an Gewebe deutlich, das in Medium unter Zugabe von 4-Chlor-3, 5dimethylphenoxyessigsäure gewachsen war. Der hemmende Effekt der Halogenierung der Verbindung in Position 4 war durch die benachbarten Methylgruppen vollkommen aufgehoben worden. Die Sekundärstoffbildung war sogar im Vergleich zum Einfluß der nicht-substituierten Phenoxyessigsäure deutlich gefördert worden.

Ein allgemeiner Effekt, der von diesen sehr unterschiedlichen Verbindungen hervorgerufen worden war, war die Korrelation der Wirkung auf den Gehalt der Vorstufe und den daraus gebildeten Alkaloiden. Die Hemmung der Vorstufenbildung hatte auch immer einen niedrigen Sekundärstoffgehalt zur Folge. In keinem Fall konnte beobachtet werden, daß nur allein die Synthese der Alkaloide gefördert wurde und daher zu vollständigem Ver-

brauch der Vorstufe geführt hatte. Ein positiver Effekt auf die Bildung von Loganin/Secologanin hatte auch immer zu einer erhöhten Bildung der Alkaloide geführt.

Einige der oben beschriebenen Wirkungen konnten auch bei dem Einfluß substituierter Phenoxyessigsäuren auf die Anthrachinonbildung von Morinda citrifolia Suspensionskulturen gemacht werden. So konnte auch in diesem System eine deutliche Hemmung der Produktbildung durch para-halogenierte Verbindungen verzeichnet werden. Methylierte Phenoxyessigsäuren hatten auch hier deutlich fördernde Wirkung gezeigt und zusätzliche Methylierung para-halogenierter Verbindungen konnte die Hemmung der Anthrachinonbildung partiell wieder aufheben (SCHULTE, 1978).

Eine Aussage über die Wirkungsweise der verschiedenen substituierten Phenoxyessigsäuren kann hier nicht gemacht werden, da der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, unbekannt ist (SCHULTE, 1978). Da einige Substituenten auf die so verschiedenen Biosynthesewege der Indolalkaloide und der Anthrachinonglykoside die gleiche Wirkung gezeigt hatten, und bei den Indolalkaloiden auch die Bildung der monoterpenoiden Vorstufe gleichermaßen beeinflußt worden war, kann vermutet werden, daß die hier verwendeten Effektoren sehr früh, eventuell bereits in den Primärstoffwechsel der Zellen regulierend eingreifen. Unter dem Einfluß der hier verwendeten Effektoren waren die Zellen, die alle aus der Population einer Suspensionskultur entstammten, zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen fähig. Zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Gehalt an der Vorstufe Loganin/Secologanin bestand ein Unterschied um den Faktor 120, die Gehalte der gebildeten Produkte unterschieden sich um den Faktor 20. In den Zellen war

Sehr deutlich wird dieser Effekt auch bei Phenoxyessigsäuren, die mit Methylgruppen substituiert worden waren. Methylierte Phenoxyessigsäuren übten allgemein einen positiven Effekt auf die Bereitstellung der Vorstufe und auch auf die Akkumulation der Indolalkaloide aus (Abbildung 10 A und B). 3-Methyl- und 3,4-Dimethylphenoxyessigsäure hatten unter allen getesteten Verbindungen die deutlichste Erhöhung des Vorstufengehaltes bewirkt, und als Folge davon war auch die Bildung der Alkaloide angestiegen. Höchste Bildung der Alkaloide wurde durch die in Position 2, 4, 6 dreifach methylierte Phenoxyessigsäure herbeigeführt. Dabei zeigte sich wiederum deutliche Abhängigkeit von den Positionen, die die Methylgruppen im Molekül besetzten. Methylierung in Positionen 2, 3, 5 hatte gar keinen Effekt auf die Bildung der Inhaltsstoffe gehabt. Die fördernde Wirkung der Methylgruppensubstitution sowohl auf die Bildung der Vorstufe als auch auf die Höhe der enthaltenen Alkaloide wurde an Gewebe deutlich, das in Medium unter Zugabe von 4-Chlor-3, 5dimethylphenoxyessigsäure gewachsen war. Der hemmende Effekt der Halogenierung der Verbindung in Position 4 war durch die benachbarten Methylgruppen vollkommen aufgehoben worden. Die Sekundärstoffbildung war sogar im Vergleich zum Einfluß der nicht-substituierten Phenoxyessigsäure deutlich gefördert worden.

Ein allgemeiner Effekt, der von diesen sehr unterschiedlichen Verbindungen hervorgerufen worden war, war die Korrelation der Wirkung auf den Gehalt der Vorstufe und den daraus gebildeten Alkaloiden. Die Hemmung der Vorstufenbildung hatte auch immer einen niedrigen Sekundärstoffgehalt zur Folge. In keinem Fall konnte beobachtet werden, daß nur allein die Synthese der Alkaloide gefördert wurde und daher zu vollständigem Ver-

brauch der Vorstufe geführt hatte. Ein positiver Effekt auf die Bildung von Loganin/Secologanin hatte auch immer zu einer erhöhten Bildung der Alkaloide geführt.

Einige der oben beschriebenen Wirkungen konnten auch bei dem Einfluß substituierter Phenoxyessigsäuren auf die Anthrachinonbildung von Morinda citrifolia Suspensionskulturen gemacht werden. So konnte auch in diesem System eine deutliche Hemmung der Produktbildung durch para-halogenierte Verbindungen verzeichnet werden. Methylierte Phenoxyessigsäuren hatten auch hier deutlich fördernde Wirkung gezeigt und zusätzliche Methylierung para-halogenierter Verbindungen konnte die Hemmung der Anthrachinonbildung partiell wieder aufheben (SCHULTE, 1978).

Eine Aussage über die Wirkungsweise der verschiedenen substituierten Phenoxyessigsäuren kann hier nicht gemacht werden, da der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, unbekannt ist (SCHULTE, 1978). Da einige Substituenten auf die so verschiedenen Biosynthesewege der Indolalkaloide und der Anthrachinonglykoside die gleiche Wirkung gezeigt hatten, und bei den Indolalkaloiden auch die Bildung der monoterpenoiden Vorstufe gleichermaßen beeinflusst worden war, kann vermutet werden, daß die hier verwendeten Effektoren sehr früh, eventuell bereits in den Primärstoffwechsel der Zellen regulierend eingreifen. Unter dem Einfluß der hier verwendeten Effektoren waren die Zellen, die alle aus der Population einer Suspensionskultur entstammten, zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen fähig. Zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Gehalt an der Vorstufe Loganin/Secologanin bestand ein Unterschied um den Faktor 120, die Gehalte der gebildeten Produkte unterschieden sich um den Faktor 20. In den Zellen war

prinzipiell die Potenz zur hohen Produktion von Inhaltsstoffen vorhanden, konnte aber erst durch Zugabe einer geeigneten Verbindung abgerufen werden. Durch optimale Hormonzusammensetzung im Medium können die gewünschten Stoffwechselleistungen der Zellen gezielt gesteuert werden, so daß die Produktbildung deutlich erhöht wird und zu einer effektiven Naturstoffproduktion durch pflanzliche Zellkulturen führen kann.

4.2. Applikation von Alkaloidvorstufen

An Suspensionskulturen von Catharanthus roseus waren bereits die Einflüsse verschiedener Vorstufen auf die Alkaloidbildung untersucht worden (ZENK et al., 1977). Dabei wurden einerseits Verbindungen gewählt, die als Bausteine für den Monoterpenteil der Alkaloide dienen können, andere wiederum hätten als Vorstufen für den Indolteil der Produkte verwendet werden können. Diese Verbindungen waren in steigenden Konzentrationen von 0 - 1 g/l eingesetzt worden, doch bei den meisten der applizierten Verbindungen hatte bereits die niedrigste gewählte Konzentration einen deutlichen Hemmeffekt gezeigt. So wurde nach Zugabe von Geraniol, einem Vorläufer des Monoterpenanteils von Serpentin und Ajmalicin, schon durch Zugabe von 50 mg/l die Alkaloidbildung um 50 % gesenkt (DEUS, 1978). Ausnahmen machten dabei nur Logenin, das eine Steigerung um 100 % und L-Tryptophan, das eine dreifache Förderung des Alkaloidgehaltes erbrachte. Das D-Isomere des Tryptophans hatte dagegen keine Wirkung. Diesen Befunden standen die Ergebnisse von DÖLLER et al. (1976) entgegen. Bei dem von diesen Autoren untersuchten Kallusstamm von Catharanthus roseus wurde die Alkaloidbildung ebenfalls durch Geraniol und Tryptamin gehemmt, aber auch die Applikation von Tryptophan konnte in keiner der getesteten Konzentrationen

die Synthese der Indolalkaloide fördern. CZYGAN (1975) hatte den Einfluß von Tryptophan auf die Synthese von dimeren Indolalkaloiden in Kalluskulturen von Catharanthus roseus untersucht. Dabei stellte er fest, daß die Wirkung dieser Aminosäure auf die Alkaloidbildung (Vinblastin und Vincalcucoblastin) sehr von dem zur Kultivierung der Zellen verwendeten Medium abhing. Wuchsen die Kalluskulturen auf Medium, das optimal für die Bildung der Inhaltsstoffe war, konnte der Alkaloidgehalt nicht mehr durch die Zugabe von Tryptophan gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte ein Zusatz von 200 mg Tryptophan je Liter in suboptimalem Medium die Alkaloidkonzentrationen auf den entsprechenden Wert optimaler Kulturbedingungen steigern. Um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu überprüfen, wurden verschiedene Stämme von Catharanthus roseus erneut mit Tryptophan inkubiert, um den Effekt dieser Aminosäure auf das Wachstum und die Alkaloidbildung der Zellen zu untersuchen.

Gewebe von 50 verschiedenen Stämmen von Catharanthus roseus wurden in dem für die Alkaloidbildung optimierten Medium (ZENK et al., 1977) kultiviert. In Parallelkulturen wurde den Zellen dieser Stämme unter den gleichen Bedingungen L-Tryptophan appliziert. Dabei wurde die sich zuvor für die Bildung der Indolalkaloide optimal erwiesene Konzentration von 500 mg/l gewählt. Nach 14tägiger Inkubationszeit wurden Wachstum und Alkaloidbildung der Zellstämme analysiert und der Einfluß der Vorstufe Tryptophan untersucht. In Tabelle 5 ist eine Auswahl der getesteten Zellstämme dargestellt. Der Alkaloidgehalt bezog sich in diesem Fall auf die Bildung von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin.

Tabelle 5: Alkaloïdbildung verschiedener Stämme von Catharanthus roseus in Produktionsmedium ohne und mit L-Tryptophan

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin

Stamm	Produktionsmedium		Produktionsmedium + L-Tryptophan	
	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide* (mg/l)	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide* (mg/l)
MT 6	11.8	64.5	20.7	83.0
MT 1	20.8	136.9	15.1	26.3
MT 7	23.4	112.7	25.1	74.5
MT 8	26.3	122.4	21.3	54.7
MT 9	20.8	123.4	19.5	85.5
MT 24	17.1	68.5	17.4	246.9
SR 28	13.0	112.2	19.7	479.8
LS 12	20.2	222.3	22.0	97.6
SR 30	19.0	45.5	12.2	71.5
PU 10	17.6	20.7	18.2	67.1
R 2	25.3	54.3	20.4	46.5

Die Zugabe von Tryptophan hatte bei den Zellstämmen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Bei sechs der hier dargestellten Stämme konnte eine deutliche Hemmung der Alkaloidbildung beobachtet werden, die von einem verringerten Wachstum begleitet sein konnte. Der verringerte Sekundärstoffgehalt der Kulturen konnte aber nicht unmittelbar auf die gehemmte Produktion der Zellmasse zurückgeführt werden, da z.B. bei Stamm LS 12 das Wachstum der Zellen bei verminderter Alkaloidbildung unter dem Einfluß von Tryptophan gefördert worden war. Umgekehrt konnte auch bei der durch Tryptophan positiv beeinflussten Alkaloidbildung ein Wachstumseffekt ausgeschlossen werden, da Stamm MT 24 bei gleichbleibender Zellmasse nach Zugabe von Tryptophan zu einer annähernd vierfachen Syntheseleistung befähigt war. Der höchste gemessene Sekundärstoffgehalt konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nach Applikation von L-Tryptophan bei Stamm SR 28 festgestellt werden. Er hatte während der 14tägigen Kultivierung bei durchschnittlicher Produktion von Zellmasse 480 mg/l der getesteten Alkaloide gebildet und übertraf damit den durchschnittlichen Gehalt der hier untersuchten Zellstämme um den Faktor 4.

Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse lassen sich auch die widersprüchlichen Befunden erklären, die in verschiedenen Arbeitsgruppen bei der Untersuchung des Tryptophaneffektes auf Kulturen von Catharanthus roseus erzielt worden waren. Die positive oder negative Wirkung der Aminosäure auf die Bildung von Inhaltsstoffen hängt von dem untersuchten Zellstamm ab. Zellen von Catharanthus roseus sind also nicht generell dazu in der Lage, mit erhöhter Alkaloidbildung zu reagieren, wenn ihnen extern L-Tryptophan angeboten wird. Auch diese unterschiedliche Reaktion auf das Angebot einer Vorstufe

verdeutlicht die Variationsmöglichkeiten, die die Stoffwechselleistungen pflanzlicher Zellen bieten. Zellstämme, die auf Fütterung von L-Tryptophan mit deutlich erhöhter Alkaloidbildung reagiert hatten, waren möglicherweise nicht in der Lage gewesen, ausreichende Mengen dieser Vorstufe für die Indolalkaloidbildung bereitzustellen. Erst durch externe Zugabe der Aminosäure konnten ihre Produktionsfähigkeiten effektiv ausgenutzt werden, um so einen deutlichen Anstieg der Inhaltsstoffe im Gewebe dieser Stämme zu erzielen. Andererseits trat bei Zellstämmen, die auch ohne Tryptophanzugabe bereits zu guten Syntheseleistungen fähig waren, deutliche Hemmung der Alkaloidbildung ein, wenn ihnen zusätzlich Tryptophan verabreicht wurde. Offensichtlich konnten diese Stämme die nötige Vorstufe in ausreichendem Maße bereitstellen, so daß sich vermutlich ein Überangebot der Vorstufe durch extern zugegebenes Tryptophan hemmend auf die Produktionsfähigkeit der Zellstämme ausgewirkt hatte.

Bei Untersuchungen der Strictosidin-Synthase aus Gewebekulturen von Catharanthus roseus (TREIMER, 1979) konnte gezeigt werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit dieses Enzyms durch Tryptaminkonzentrationen, die höher als 1,2 mM waren, deutlich gehemmt wurde. Dieses Enzym war also durch ein Überangebot seines Substrates Tryptamin deutlich negativ beeinflusst worden. Diese Eigenschaft der Strictosidin-Synthase bietet eine Erklärungsmöglichkeit für den oben beschriebenen hemmenden Effekt des applizierten Tryptophans. Nach der für die Indolalkaloidbildung nötigen Metabolisierung des exogen zugesetzten Tryptophans zu seinem biogenen Amin, war möglicherweise der Tryptamingehalt in den Zellen soweit angestiegen, daß die Strictosidin-Synthase Aktivität gehemmt wurde, und somit die Akkumulation von Indolalkaloiden unter diesen Bedingungen deutlich verringert war.

Interessant ist in dieser Hinsicht Stamm SR 28. Er wies im Medium ohne Tryptophanzusatz einen Alkaloidgehalt auf, der dem jener Zellstämme entsprach, die nach Zugabe von Tryptophan deutlich gehemmt waren. Auch er mußte ebenfalls in der Lage gewesen sein, bereits selbst einen hohen Vorstufengehalt zu bilden. Trotzdem wurde nach Applikation von Tryptophan ein drastischer Anstieg bei der Bildung der Inhaltsstoffe verzeichnet. Die Zellen dieses Stammes waren daher entweder fähig, das angebotene Tryptophan sehr schnell zu metabolisieren, so daß die hemmende Konzentration des Tryptamins nicht erreicht wurde, oder aber die Strictosidin-Synthase in diesem Gewebe war für die Substrathemmung durch Tryptamin sehr viel weniger empfindlich als es bei den übrigen Stämmen der Fall gewesen war.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse waren an Zellstämmen gewonnen worden, die aus verschiedenen Populationen von Catharanthus roseus hervorgegangen waren. Zur Untersuchung, ob auch bereits innerhalb einer Zellpopulation unterschiedliche Reaktion auf die Zugabe von Vorstufen verzeichnet werden können, wurde wiederum die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Zellkolonien sollten hier auf verschiedene Fähigkeit der Zellen zur Verwendung applizierter Vorstufen hindeuten. Demnach sollte es möglich sein, mit dieser Selektionsmethode Zellstämme zu isolieren, deren Alkaloidbildung nach Zugabe einer Vorstufe gefördert werden kann.

Für diese Untersuchungen wurden Zellen einer Suspensionskultur von Catharanthus roseus in dem Alkaloidproduktionsmedium unter Zusatz von 500 mg/l L-Tryptophan plattiert. Nachdem die Zellen zu Kolonien von ca. 3 mm Durchmesser

herangewachsen waren, wurde ihre Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht unter dem Mikroskop untersucht. Dabei zeigten sich auch innerhalb dieser Zellpopulation deutliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz, die Zellen variierten also in der Fähigkeit, die im Medium vorhandene Vorstufe zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe zu nutzen. Von den untersuchten Petrischalenkulturen wurden Zellkolonien selektiert, die sich durch intensive Fluoreszenz von den anderen Kolonien der Population unterschieden. Nachdem aus den selektierten Kolonien Kallusstämme etabliert worden waren, wurden Zellen jedes Stammes für 4 Wochen auf Produktionsmedium mit und ohne Zusatz von 500 mg/l L-Tryptophan kultiviert. Danach wurde die Bildung von Serpentin und Ajmalicin unter den verschiedenen Bedingungen verglichen. Tabelle 6 gibt die Ergebnisse der Untersuchungen wieder. Diese hier aufgeführten Stämme hatten als Zellkolonie bei Zugabe von Tryptophan zum Medium intensiv fluoresziert und dieser positive Effekt der Vorstufe wurde auch an den heranewachsenen Kalluskulturen deutlich. Bei allen Kallusstämmen war die Alkaloidbildung durch Zugabe von Tryptophan drastisch erhöht worden. Die beste Steigerung des Sekundärstoffgehaltes konnte bei Stamm RT 21 erreicht werden, der nach Tryptophanzugabe 9mal mehr Alkaloide bildete als in dem Medium ohne Vorstufe. Die Höhe der Alkaloidanreicherung war bei allen untersuchten Stämmen verschieden, doch es konnten Gehalte erzielt werden, die z.T. deutlich über dem Serpentin- und Ajmalicingehalt des intakten Wurzelgewebes von Catharanthus roseus (0,5 %) lagen.

Ob sich dieser positive Tryptophaneffekt auch nach mehreren Passagen und nach Anlage von Suspensionskulturen bemerkbar macht, wurde an einigen der selektierten Zellstämme überprüft (Tabelle 7). Das Gewebe wurde 14 Tage

Tabelle 6: Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die von Produktionsmedium unter Zusatz von L-Tryptophan (500 mg/l) aufgrund intensiver Fluoreszenz selektiert worden waren, und 4 Wochen auf Produktionsmedium mit und ohne Zugabe von L-Tryptophan kultiviert worden waren.

Stamm	Produktionsmedium	Produktionsmedium + L-Tryptophan
	Serpentin+Ajmalicin (% TG)	Serpentin+Ajmalicin (% TG)
RT 40	0.19	0.58
RT 19	0.18	0.62
RT 21	0.05	0.45
RT 69	0.19	0.27
RT 62	0.17	0.27
RT 65	0.13	0.46
RT 49	0.28	0.72
RT 39	0.26	0.40
RT 56	0.32	0.80
RT 60	0.36	0.63
RT 22	0.09	0.47

in Produktionsmedium mit und ohne Zugabe von Tryptophan kultiviert und anschließend der Gehalt der Zellen an Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin untersucht. Die Stämme zeigten in beiden Medien sehr unterschiedliche Produktionsfähigkeit, aber in allen Fällen konnte durch Applikation von L-Tryptophan eine deutlich gesteigerte Alkaloidbildung festgestellt werden. Im besten Fall wurde die Alkaloidbildung bei gleichzeitiger Zunahme des Zellwachstums um 110 % ($\hat{=}$ 84 mg/l) geför-

Tabelle 7: Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die von Produktionsmedium unter Zugabe von L-Tryptophan selektiert worden waren, und als Suspensionskultur nach 14-tägiger Kultivierung in Produktionsmedium mit L-Tryptophan erhöhte Alkaloidbildung zeigten.

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin

Stamm	Produktionsmedium		Produktionsmedium-L-Tryptophan	
	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide * (mg/l)	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide * (mg/l)
RT 19	19.5	131.8	19.6	177.6
RT 32	8.9	75.8	15.6	160.1
RT 49	10.8	23.8	20.4	66.6
RT 34	10.8	49.2	19.3	73.7
RT 23	12.5	28.1	22.0	85.9
RT 21	10.1	64.0	26.2	134.8

dert (Stamm RT 32). Der höchste Gehalt, der nach Zugabe der Vorstufe bei den hier untersuchten Stämmen erzielt worden war, betrug 178 mg/l bei gleicher Produktion von Zellmasse im Vergleich zu Vorstufen-freiem Medium.

Es war also möglich gewesen, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aus einer Population von Zellen solche zu selektieren, die nach Zugabe von Tryptophan zur erhöhten Bildung von Indolalkaloiden befähigt waren.

Auch die Vorstufe Tryptamin war bereits zu einer Suspensionskultur von Catharanthus roseus zugesetzt worden und hatte dabei sowohl das Wachstum als auch die Alkaloidbildung der Zellen deutlich gehemmt (ZENK et al., 1977). Die Ergebnisse, die nach Zugabe der Vorstufe Tryptophan erhalten worden waren, hatten aber gezeigt, daß bereits Zellen einer Population in ihrer Reaktion auf eine zugegebene Vorstufe sehr differieren können. Daher wurde vermutet, daß auch der hemmende Effekt von Tryptamin kein generelles Phänomen ist, sondern ein Charakteristikum des Zellstammes war, der für die 1977 beschriebenen Versuche verwendet worden war. Um diese Annahme experimentell zu belegen, wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Zellkolonien von Catharanthus roseus untersucht, die nach Plattieren auf Produktionsmedium unter dem Einfluß von Tryptamin (250 mg/l) herangewachsen waren. In den Petrischalen fielen auch unter diesen Kulturbedingungen Zellkolonien auf, die überdurchschnittlich intensiv fluoreszierten. Diese Zellkolonien wurden zur weiteren Kultivierung selektiert. Gleichzeitig wurden aus der Population Kolonien entnommen, deren Fluoreszenz sehr gering war. Sowohl intensiv als auch schwach fluoreszierende Kolonien wuchsen zu Kallusstämmen heran, deren Gewebe nach mehreren Passagen auf Produktionsmedium mit und ohne Tryptaminzusatz übertragen werden konnte.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Alkaloidbildung von verschiedenen Zellstämmen, die nach Einfluß von Tryptamin aus einer Zellpopulation selektiert worden waren. Die varianten Stoffwechselleistungen von Zellen einer äußerlich homogen erscheinenden Population drückten sich auch in ihrer Reaktion auf die Applikation der Vorstufe Tryptamin aus. Kolonien, die aufgrund intensiver Fluoreszenz selektiert worden waren, hatten nach vierwöchiger Kultivierung in Tryptamin-haltigem Medium bewiesen, daß ihre Zellen in der Lage waren, die zugegebene Vorstufe zu metabolisieren und daraufhin vermehrt Indolalkaloide zu produzieren. Die erzielten Gehalte übertrafen z.T. sogar den Gehalt des differenzierten Wurzelgewebes. Wuchs das Kallusgewebe dieser Stämme dagegen auf dem normalen Produktionsmedium ohne Tryptamin, war die Alkaloidbildung teilweise sogar um den Faktor 10 niedriger. Mit Ausnahme von Stamm T 60, bei dem auch ohne Zugabe von Vorstufe eine deutliche Sekundärstoffbildung stattgefunden hatte, waren die durch Tryptamin positiv beeinflussten Zellstämme offensichtlich erst durch Applikation der Vorstufe zu einer effektiven Alkaloidbildung befähigt.

An Kalluskulturen, die aus schwach fluoreszierenden Zellkolonien herangewachsen waren, konnte der hemmende Effekt des Tryptamin auf die Anreicherung der Alkaloide beobachtet werden. Auf Tryptamin-haltigem Medium war der Alkaloidgehalt der Zellkolonien niedrig gewesen und auch die aus ihnen angelegten Kalluskulturen waren nur auf Vorstufen-freiem Medium zur hohen Produktion fähig. Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten der Stämme nach Zugabe von Tryptamin sind vermutlich die gleichen, wie sie schon für die Ergebnisse nach der Applikation von Tryptophan diskutiert worden sind.

Tabelle 8: Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die als Kalluskulturen während 28tägiger Kultivierung auf Produktionsmedium mit Tryptamin (250 mg/l) eine Steigerung (A) oder Hemmung (B) der Alkaloidbildung zeigten.

Stamm	Produktionsmedium	Produktionsmedium+Tryptamin
	Serpentin + Ajmalicin (% TG)	Serpentin + Ajmalicin (% TG)
A T 59	0.16	0.44
T 60	0.36	0.74
T 17-8	0.06	0.17
T 53	0.01	0.10
T 63	0.06	0.64
T 69	0.04	0.40
T 58	0.10	0.51
B T 52	0.46	0.14
T 51	0.18	0.04
T 39	0.26	0.08
T 66	0.18	0.04
T 55	1.04	0.30
T 57	1.00	0.56

Auch an Gewebe von Suspensionskulturen konnte eine positive und negative Wirkung des Tryptamins beobachtet werden (Tabelle 9). Die Vorstufe konnte einerseits die Alkaloidbildung um annähernd 300 % auf den überdurchschnittlich hohen Gehalt von 269 mg/l steigern (Stamm LS 40), andererseits bei Gewebe eines anderen Stammes (S 21) um 50 % senken.

Tabelle 9: Der Einfluß von Tryptamin (250 mg/l) auf Suspensionskulturen verschiedener Stämme von Catharanthus roseus während 14tägiger Kultivierung in Produktionsmedium

* Summe von Serpentin und Ajmalicin

Stamm	Produktionsmedium		Produktionsmedium-Tryptamin		Tryptamin- effekt
	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide * (mg/l)	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide * (mg/l)	
MT 20-1	11.9	54.8	14.6	82.0	+
MT 11	18.7	122.2	17.5	96.3	-
RT 82	17.4	130.9	15.3	73.3	-
S 21	20.2	237.1	20.3	118.6	-
LS 40	15.5	96.1	23.0	269.2	+
MT 56	16.8	45.6	18.4	69.1	+

Wird durch Zugabe einer Vorstufe versucht, die Produktion von Naturstoffen durch kultivierte Zellen zu erhöhen, muß also zuvor überprüft werden, ob die Zellen überhaupt fähig sind, die angebotene Verbindung für die Bildung ihrer Inhaltsstoffe zusätzlich zu nutzen. In diesem Zusammenhang sind Zellstämme interessant, die durch Mangel an interner Vorstufe in ihrer Produktion limitiert sind und erst durch äußere Zugabe des limitierenden Metaboliten zur effektiven Stoffwechselleistung befähigt sind. Von großem Vorteil sind dabei Zellstämme, die trotz hohem internen Vorstufengehalt nicht durch zusätzliche Applikation von Vorstufen in ihrer Stoffwechselleistung gehemmt werden, sondern zu überdurchschnittlicher Produktbildung angeregt werden können, wie es bei dem hier selektierten Stamm SR 28 der Fall gewesen war. Solche Stämme lassen sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aus einer Zellpopulation selektieren, diese Selektionsmethode hat sich also auch in diesem Fall als geeignet erwiesen, um Zellkolonien mit unterschiedlichen Stoffwechselleistungen zu erkennen.

5. Einfluß von Aminosäure-Analoga auf Wachstum und Sekundärstoffakkumulation

Ist es allein durch Variation der Mediumzusammensetzung oder durch Applikation von Vorstufen nicht mehr möglich, die Sekundärstoffproduktion einer Zellkultur zu erhöhen, wäre die Selektion von Regulationsmutanten eine aussichtsreiche Methode, um Zellstämme zu gewinnen, die sich durch erhöhte Produktion ihrer Inhaltsstoffe auszeichnen.

Diese Technik hat besonders für die fermentative Produktion von Aminosäuren durch Mutanten einiger Mikroorganismen an Bedeutung gewonnen (ABE, 1972). So wurden Mikroorganismenstämme, die sich gegen ein zuvor appliziertes

Aminosäureanalogon als resistent erwiesen hatten, erfolgreich zur biotechnologischen Gewinnung der entsprechenden Aminosäure eingesetzt. Ihre Resistenz gegenüber dem Analogon beruhte auf ihrer Fähigkeit, die jeweilige Aminosäure in sehr viel größerem Maße zu synthetisieren, als es bei dem Wildtyp der Fall war. Dadurch wurden die normalerweise toxisch wirkenden Aminosäureanaloge durch Verdünnen in der Zelle selbst unschädlich gemacht, so daß diese Regulationsmutanten auch unter dem Einfluß sehr hoher Analoga-Konzentrationen überleben konnten. Solche überproduzierenden Stämme werden inzwischen für die kommerzielle Produktion von Aminosäuren verwendet, da die Effektivität biotechnologischer Prozesse durch Verwendung von solcher Art gewonnener Hochleistungsstämmen gefördert wurde. Diese Erfolge in der Mikrobiologie berechtigten zur Hoffnung, daß sich diese Techniken auch auf pflanzliche Zellkulturen anwenden lassen. Viele der besonders therapeutisch wichtigen pflanzlichen Inhaltsstoffe gehören zu der Gruppe der Alkaloide, die sich wiederum biogenetisch von Aminosäuren ableiten. Wie die zuvor beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann die Bereitstellung der Aminosäuren als Vorstufen für die Alkaloidbildung in der Zelle selbst der limitierende Faktor für die Produktbildung in einer Zellkultur sein. Bei Regulationsmutanten, die gegen ein Aminosäureanalogon resistent sind, beruht die Unempfindlichkeit auf einem erhöhten Gehalt der entsprechenden Aminosäure. Sind die resistenten Zellen in der Lage, dieses Überangebot der Aminosäure zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe zu nutzen, sollten sie dadurch zu einer erhöhten Akkumulation der von der Aminosäure abgeleiteten Produkte fähig sein.

Durch Behandlung mit Aminosäureanaloge konnten in mehreren Fällen resistente Zellstämme pflanzlicher Zellkulturen erhalten werden. Nach Behandlung mit p-Fluorophenylalanin konnten aus Suspensionskulturen von Daucus

carota resistente Stämme gewonnen werden, die einen deutlich erhöhten Gehalt an freiem Phenylalanin und Tyrosin aufwiesen. Bei den unter gleichen Bedingungen selektierten resistenten Zellstämmen von Nicotiana tabacum konnte dagegen kein Anstieg dieser Aminosäuren gegenüber dem Gehalt der Wildtypzellen verzeichnet werden. Daß sie trotzdem zur erhöhten Synthese von Phenylalanin und Tyrosin befähigt waren, konnte nur indirekt an ihrem erhöhten Gehalt der sich von Phenylalanin ableitenden Sekundärstoffe festgestellt werden (PALMER und WIDHOLM, 1975).

Durch Applikation von 5-Methyltryptophan an Zellkulturen von Catharanthus roseus sollte versucht werden, resistente Regulationsmutanten aufzufinden. Dabei wurde erwartet, daß die resistenten Zellen vermehrt Tryptophan akkumulieren. Tryptophan als biogenetische Vorstufe der Indolalkaloide stünde also in größerem Umfang für die Bildung der Inhaltsstoffe zur Verfügung, so daß die resistenten Zellen zur gesteigerten Alkaloidproduktion fähig sein sollten.

5.1. Applikation von 5-Methyltryptophan an Kulturen von Catharanthus roseus

Durch Behandlung von Catharanthus roseus Suspensionskulturen mit 5-Methyltryptophan war bereits versucht worden, resistente Zellstämmen zu gewinnen, die durch erhöhten Tryptophangehalt zur gesteigerten Indolalkaloidbiosynthese fähig sind (SCHALLENBERG und BERLIN, 1979). Es konnten dabei resistente Linien isoliert werden, die wohl einen erhöhten Tryptophangehalt aufwiesen, aber keiner der Stämme war dadurch zur vermehrten Bildung von

Indolalkaloiden angeregt worden. SCHALLENBERG und BERLIN schlossen aus diesen Ergebnissen, daß eine veränderte Regulation in der Biosynthese der Vorstufe noch keine ausreichende Vorbedingung für die Induktion der Sekundärstoffbildung selbst ist (SCHALLENBERG und BERLIN, 1979).

Normalerweise tritt Resistenz gegen 5-Methyltryptophan nur mit einer sehr niedrigen Frequenz innerhalb einer Zellpopulation auf (WIDHOLM, 1977), es ist daher notwendig, eine sehr große Anzahl an Zellen zu untersuchen, um überhaupt resistente Linien auffinden zu können. Die erfolgreiche Selektion resistenter Zellstämme, die sich zudem noch durch gesteigerte Produktbildung auszeichnen, ist daher von einer geeigneten Methode abhängig, die es erlaubt, auch sehr umfangreiche Zellpopulationen ohne größeren Aufwand zu testen. Für derartige Untersuchungen bot sich wiederum die Fluoreszenzmikroskopie an, mit deren Hilfe eine sehr große Anzahl von Zellen innerhalb kurzer Zeit untersucht werden konnte, um dabei aufgrund der Fluoreszenzintensität zwischen Zellen mit hohem und solchen mit niedrigem Alkaloidgehalt zu unterscheiden. Durch Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie sollte versucht werden, nach Behandlung mit 5-Methyltryptophan aus einer Zellpopulation von Catharanthus roseus resistente Zellstämme zu selektieren, deren Alkaloidbildung deutlich gesteigert war.

5.1.1. Wachstum und Alkaloidbildung in Abhängigkeit von der 5-Methyltryptophan-Konzentration

Um den Effekt von 5-Methyltryptophan auf das Wachstum und die Alkaloidbildung des Gewebes von Catharanthus roseus zu untersuchen, wurden Zellen einer Suspensionskultur mit steigenden Konzentrationen von 5-Methyltryp-

tophan (0.6×10^{-4} M) im Produktionsmedium 14 Tage lang bei 30° C kultiviert (Abbildung 12).

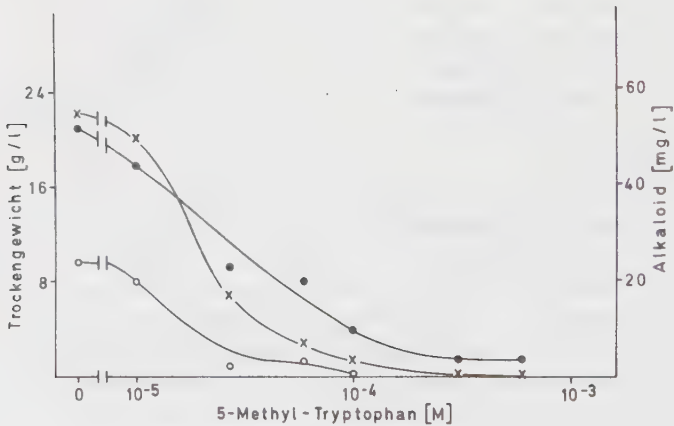


Abb. 12: Wachstum (●—●), Serpentin- (x—x) und Ajmalicinbildung (○—○) während 14tägiger Kultivierung von *Catharanthus roseus* Zellsuspensionskulturen in Produktionsmedium unter Zugabe steigender Methyltryptophankonzentrationen.

Während die Zellen im Medium ohne Aminosäureanalogon gutes Wachstum und durchschnittliche Alkaloidbildung zeigten, war schon bei einer Methyltryptophan-Konzentration von 10^{-5} M Hemmung der Zellen zu verzeichnen. Bereits bei der nächsthöheren Konzentration (3×10^{-5} M) waren sowohl das Wachstum als auch die Synthese der Inhaltsstoffe um mehr als 50 % gehemmt worden. Ein

Hemmstoffgehalt von mehr als 10^{-4} M wirkte absolut toxisch auf die Zellen. Für alle weiteren Versuche zur Methyltryptophanbehandlung von Catharanthus roseus wurde der Hemmstoff in einer Konzentration von 5×10^{-5} M zum Produktionsmedium dazugesetzt.

5.1.2. Alkaloidbildung von Methyltryptophan-behandelten und unbehandelten Zellkolonien

Zellen von Catharanthus roseus, deren Reaktion auf den Hemmstoff Methyltryptophan untersucht werden sollten, wurden in Produktionsmedium unter Zugabe des Aminosäureanalogons plattiert. Durch das Plattieren wurde eine feine und gleichmäßige Verteilung von kleinen Zellaggregaten im Agarmedium erreicht, so daß einzelne Aggregate separat beobachtet werden konnten. Zudem war es möglich, eine Population mit sehr umfangreicher Individuenzahl ($3-4 \times 10^5$ pro Plattierungsvorgang) für Mutations- und Selektionsexperimente auf kleinstem Raum zu kultivieren. Nach vierwöchiger Kultivierung der plattierten Zellen konnten resistente Zellen sofort erkannt werden, da nur sie in der Lage gewesen waren, auf dem Hemmstoffmedium zu Kolonien heranzuwachsen. Während dieser Versuchsreihe konnten in 20 Plattierungsvorgängen ca. 8×10^6 Zellaggregate untersucht werden. Bei einer mittleren Zahl von 20 Zellen pro Aggregat waren somit etwa $1,6 \times 10^7$ Zellen auf ihre Resistenz nach Inkubation mit 5-Methyltryptophan getestet worden. Die sich gegenüber dem Hemmstoff als resistent erwiesenen Zellkolonien konnten anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops betrachtet werden, um aus ihnen jene Zellkolonien mit intensiver Fluoreszenz zu selektieren.

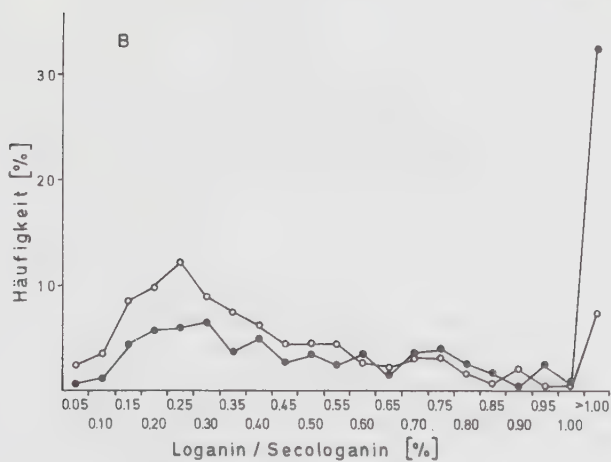
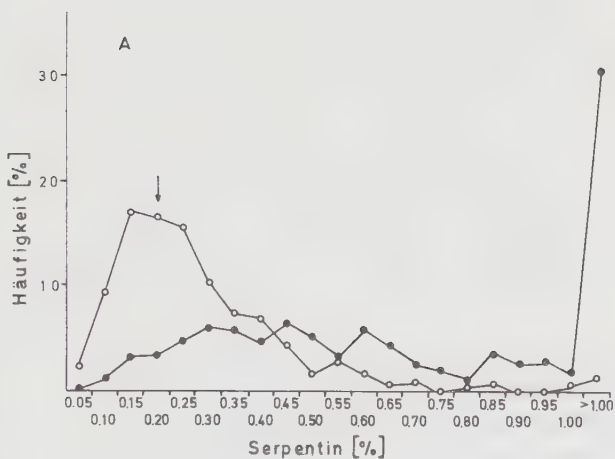
Um die Selektionsmethode mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auch unter Einfluß von Methyltryptophan zu erpro-

ben, wurden 400 Zellkolonien, die sich auf Methyltryptophan-Medium entwickelt hatten, aus einer Population entnommen, ohne dabei ein Selektionskriterium zugrunde zu legen. Von diesen 400 Kolonien wurden nach Bestimmung des Frischgewichtes alkoholische Extrakte hergestellt, deren Loganin/Secologanin- und Serpentinegehalte mit dem Radioimmunoassay bestimmt wurden. Daraufhin wurden Kolonien, die ebenfalls auf Methyltryptophan-Medium gewachsen waren und der gleichen Population entstammten, fluoreszenzmikroskopisch untersucht und solche selektiert, die sich durch intensive Fluoreszenz auszeichneten. 400 dieser Kolonien wurden ebenfalls extrahiert und immunologisch analysiert. Der Loganin/Secologanin- und der Serpentinegehalt der Extrakte wurden prozentual auf das Trockengewicht der Kolonien bezogen. Die Häufigkeitsverteilung dieser Gehalte von selektierten und nicht-selektierten auf Methyltryptophan-Medium gewachsenen Zellkolonien ist in Abbildung 13 dargestellt.

Bei beiden getesteten Substanzen hatte sich die Selektion deutlich positiv ausgewirkt. So wiesen mehr als 30 % der selektierten Kolonien einen Loganin/Secologanin- und Serpentinegehalt von mehr als 1,0 % auf. Bei den nicht selektiv entnommenen Zellkolonien waren da-

Abb. 13: Die Häufigkeitsverteilung des Serpentin(A)- und des Loganin/Secologaningehaltes (B) von selektierten (●—●) und nicht-selektierten (○—○) Zellkolonien von Catharanthus roseus, die auf Produktionsmedium unter Zusatz von 0.05 mM 5-Methyltryptophan gewachsen waren.

→ Serpentinegehalt der Ausgangspopulation.



gegen nur 5,5 % mit einem mehr als 1,0 %igem Serpentinegehalt und nur 7,5 % mit mehr als 1,0 % Loganin/Secologaninergehalt erfaßt worden. Die Häufigkeitsverteilung in den Intervallen von 0 - 1,0 % zeigte für beide untersuchten Substanzen in den fluoreszenzmikroskopisch selektierten Kolonien eine deutliche Tendenz zu höheren Gehalten hin. Die Fluoreszenzmikroskopie konnte also auch hier erfolgreich eingesetzt werden, um Zellkolonien zu selektieren, die sich resistent gegen das Aminosäureanalogon 5-Methyltryptophan erwiesen hatten, und die als Folge ihrer Resistenz zur erhöhten Akkumulation des Indolalkaloids Serpentin fähig waren.

Ein entsprechender Selektionsversuch von Kolonien, die auf normalem Produktionsmedium gewachsen waren, ist bereits in Kapitel III.2.2. beschrieben worden (vgl. Abbildung 4). Die Zellkolonien dieser beiden Versuche leiteten sich von der gleichen Population ab, da die zum Plattieren verwendeten Zellen alle aus einer Vorkultur (Stamm MT 55) abstammten. Aufgrund dieser Voraussetzung können diese beiden Selektionsexperimente direkt verglichen werden, um auf diese Weise Informationen über die Auswirkung des Methyltryptophans auf die Alkaloidbildung der gewachsenen Zellkolonien zu erhalten.

Bei den Kolonien, die ohne Selektion nach Kultivierung auf normalem und auf Methyltryptophan-Medium untersucht worden waren, zeigte sich bereits unter dem Einfluß des Aminosäureanalogons sowohl für die Serpentin- als auch für die Loganin/Secologaninbildung eine Tendenz zu höheren Gehalten. Erstaunlicherweise ist der Gehalt der Vorstufe Loganin/Secologanin deutlicher durch Methyltryptophan beeinflußt worden als der Gehalt des Endproduktes Serpentin. Loganin/Secologanin als Monoterpenanteil des Indolalkaloidmoleküls stammt aus einem anderen Stoffwech-

selweg als die Vorstufe für den Indolteil der Alkaloide, das Tryptamin. Haben die gegenüber Methyltryptophan resistenten Zellkolonien in höherem Maße Tryptophan gebildet, so kann ihre erhöhte Alkaloidbildung auf die vermehrt zur Verfügung stehende Vorstufe Tryptophan zurückgeführt werden. Tryptophan kann aber nur schwerlich einen direkten Einfluß auf die Bildung des monoterpenoiden Molekülteils gehabt haben. Das erhaltene Ergebnis wäre nur dadurch zu erklären, daß in den Zellen durch den angestiegenen Gehalt an Tryptophan ein positiver Effekt auf die Biosynthese der Vorstufe Loganin/Secologanin ausgeübt worden war, der einerseits zur erhöhten Bildung von Loganin/Secologanin und als Folge davon zur verstärkten Bildung der Indolalkaloide geführt hatte.

Unter dem Einfluß der Selektion steigt die Wahrscheinlichkeit drastisch an, Zellkolonien zu finden, die nach Behandlung mit Methyltryptophan zu erhöhter Alkaloidbildung fähig sind. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Selektionsexperimente zusammenfassend dargestellt. Der positive Effekt der Selektion bei Zellkolonien, die sich auf normalem Produktionsmedium entwickelt hatten, ist bereits in Kapitel III.2.2. beschrieben worden. Wurden solche Kolonien untersucht, die zusätzlich dem Selektionsdruck durch das Aminosäureanalogon Methyltryptophan ausgesetzt worden waren, war die Häufigkeit, mit der überdurchschnittlich gut produzierende Zellkolonien auftraten, drastisch um den Faktor 60 erhöht. Diesen Ergebnissen zu Folge sollte es also möglich sein, aus einer Population von Methyltryptophan-behandelten Zellen Zellstämme zu isolieren, die sich nicht nur durch ihre Resistenz gegenüber dem Analogon, sondern auch durch ihre deutlich erhöhte Alkaloidbildung auszeichnen:

Tabelle 10: Der Einfluß der Selektion auf die Häufigkeitsverteilung der Loganin/Secologaningehalte und Serpentinegehalte von Zellkolonien von *Catharanthus roseus*, die auf Produktionsmedium mit und ohne Zusatz von 5-Methyltryptophan gewachsen waren.

Medium	Selektion	Prozentuale Häufigkeit im Intervall > 1.0 %	
		Loganin/Secologanin	Serpentin
Produktionsmedium	-	0	0.5
Produktionsmedium + 5-Methyltryptophan	-	7.5	1.5
Produktionsmedium	+	14.0	23.0
Produktionsmedium + 5-Methyltryptophan	+	32.5	30.0

5.1.3. Selektion von Zellkolonien nach Methyltryptophan-Behandlung

Zur Anlage neuer Zellstämme wurden die auf Produktionsmedium unter Einfluß von Methyltryptophan gewachsenen Zellkolonien unter sterilen Bedingungen selektiert (vgl. II.6.) und zuerst in den Kammern von Mikrotiterplatten, später in Petrischalen auf Medium ohne Methyltryptophan zu Kalluskulturen herangezogen. Die Kolonien entwickelten sich völlig normal und entsprachen in ihrem Wachstumsverhalten Kolonien, die von Produktionsmedium selektiert worden waren. Zum Überprüfen ihrer Produktionsfähigkeit wurden Zellen von 120 Kallusstämmen, die unter dem Einfluß von Methyltryptophan selektiert worden waren, auf Produktionsmedium übertragen. Parallel dazu wurden

120 Zellstämme, die unter normalen Bedingungen selektiert worden waren, unter den gleichen Bedingungen auf Produktionsmedium kultiviert. Nach vierwöchigem Wachstum wurden die Kalluszellen extrahiert und die Bildung von Serpentin und Ajmalicin ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden prozentual auf das Trockengewicht des nicht-extrahierten Kallusgewebes bezogen. Die Häufigkeitsverteilung der Alkaloidgehalte als Summe aus Serpentin und Ajmalicin für Kalluskulturen, die von Methyltryptophan-Medium und solchen, die von normalem Produktionsmedium selektiert worden waren, ist in Abbildung 14 dargestellt.

Auch nach mehreren Passagen auf Hemmstoff-freiem Medium hatten die von Methyltryptophan selektierten Zellstämme ihre Fähigkeit zur erhöhten Alkaloidbildung beibehalten. Innerhalb der Population von Zellstämmen, die nach Zugabe des Hemmstoffes selektiert worden waren, war die Häufigkeitsverteilung der Alkaloidbildung deutlich zu höheren Gehalten verschoben. Während bei den von Produktionsmedium selektierten Stämmen immer noch mehr als 40 % niedrige Gehalte aufwiesen und nur 0,8 % aller Stämme eine Alkaloidbildung von 0,7 % erreicht hatten, konnte bei 15,7 % der getesteten Methyltryptophan-behandelten Kallusstämmen mehr als 0,7 %ige Alkaloidbildung gemessen werden. Allein 10 % dieser Stämme enthielten mehr als 1,0 % Serpentin und Ajmalicin. Der höchste Gehalt, der bei den hier untersuchten Kallusstämmen gemessen werden konnte, betrug 1,63 % Serpentin und Ajmalicin.

Gewebe von selektierten Kallusstämmen wurde in flüssiges Wachstumsmedium übertragen. Auch als Submerskulturen wiesen die von Hemmstoff-Medium stammenden Zellen keinen Wachstumsunterschied gegenüber unbehandelten Zellstämmen auf. Gewebe von 50 Methyltryptophan-resistenten und von

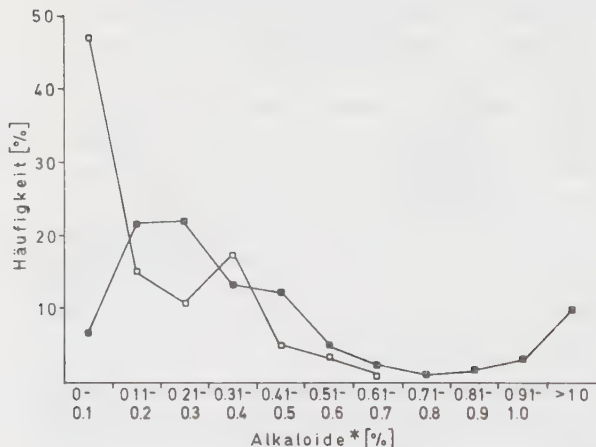


Abb. 14: Die Häufigkeitsverteilung der während 4wöchiger Kultivierung auf Produktionsmedium erreichten Alkaloidgehalte verschiedener Kallusstämmen von *Catharanthus roseus*. Vergleich der Zellstämmen, die von Produktionsmedium (□—□) selektiert worden waren, mit Zellstämmen, die unter dem Einfluß von 5-Methyltryptophan (0.05 mM) selektiert worden waren (■—■).

* Summe von Serpentin und Ajmalicin

50 unbehandelten Zellstämmen wurde in Produktionsmedium übertragen und 14 Tage bei 30° C kultiviert. Anschließend wurde der Alkaloidgehalt der Gewebe als Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin gemessen und die Häufigkeitsverteilung der Gehalte für behandelte und unbehandelte Zellstämmen bestimmt.

Aus Abbildung 15 geht hervor, daß die Wahrscheinlichkeit, hochproduzierende Stämme innerhalb einer Zellpopulation

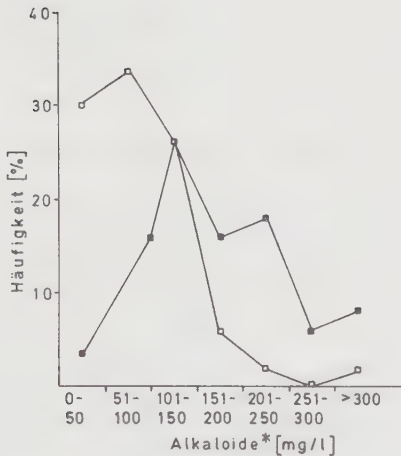


Abb. 15: Die Häufigkeitsverteilung der während 14tägiger Kultivierung in Produktionsmedium erreichten Alkaloidgehalte von Suspensionskulturen verschiedener Stämme von *Catharanthus roseus*. Vergleich der Zellstämme, die von Produktionsmedium (□—□) selektiert worden waren, mit Stämmen, die unter dem Einfluß von 5-Methyltryptophan (0.05 mM) selektiert worden waren (■—■).

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin.

zu finden, nach vorhergehender Behandlung mit Methyltryptophan deutlich angestiegen war. Besonders deutlich war der Unterschied im Intervall von 201 - 250 mg/l. Nur 1,8 % aller getesteten unbehandelten Stämme wiesen diese überdurchschnittliche Alkaloidbildung auf. Bei den Stämmen, die von Methyltryptophan Medium selektiert worden waren, waren dagegen 18 % aller Stämme in der

Lage gewesen, die untersuchten Alkaloide in einer Höhe von 201 - 250 mg/l anzureichern, und sogar 8 % hatten mehr als 300 mg/l Alkaloide gebildet.

5.1.4. Zellstämme mit erhöhter Alkaloidproduktion

Die erhöhte Fähigkeit Methyltryptophan-resistenter Zellstämme zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe wird besonders deutlich, wenn man sie mit der Produktionsleistung des zum Plattieren verwendeten Gewebes vergleicht. Die in Tabelle 11 aufgeführten Kallusstämme waren nach Methyltryptophan-Behandlung eines Zellstammes selektiert worden, der einen durchschnittlichen Alkaloidgehalt mit 0,28 % (Summe aus Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) aufgewiesen hatte. Aus dieser Zellpopulation konnten sechs resistente Stämme mit deutlich gesteigertem Alkaloidgehalt selektiert werden. Der Stamm mit der höchsten Produktionsleistung von 1,64 % hatte etwa 6mal soviel Alkaloide gebildet wie die unbehandelte Ausgangskultur.

In Tabelle 12 sind Zellstämme zusammengefaßt, die als Suspensionskulturen in Produktionsmedium überdurchschnittlich hohe Alkaloidbildung zeigten. Diese Stämme leiteten sich nach Methyltryptophan-Behandlung von einem Stamm ab, der sich zuvor bereits gegenüber dem Hemmstoff als resistent erwiesen hatte. Nach dem ersten Selektionsschritt hatte der hier als Ausgangskultur verwendete Stamm 120 mg/l Alkaloide (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) gebildet. Bei Zellstämmen, die nach der zweiten Hemmstoffbehandlung selektiert worden waren, war der Alkaloidgehalt nochmal deutlich erhöht. Maximal waren als Summe der drei hier untersuchten Alkaloide 328 mg/l gebildet worden, ein Alkaloidgehalt also, der den des zum Plattieren verwendeten Gewebes um mehr

Tabelle 11: Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die von 5-Methyltryptophan-Medium selektiert worden waren, und als Kalluskulturen auf Produktionsmedium nach vierwöchiger Kultivierung hohe Alkaloidgehalte zeigten.

Ausgangsstamm: 0,28 %.

Stamm	Serpentin (% TG)	Ajmalicin (% TG)	Tetrahydroalstonin (% TG)	Summe (% TG)
M 33	1.43	0.20	0.01	1.64
M 22	1.37	0.11	0.03	1.51
M 19	1.25	0.14	0.02	1.41
M 18	0.94	0.30	0.03	1.27
M 55	0.52	0.52	0.06	1.15
M 57	0.58	0.42	0.07	1.05

Tabelle 12: Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die von 5-Methyltryptophan-Medium selektiert worden waren, und als Suspensionskulturen in Produktionsmedium nach 14tägiger Kultivierung überdurchschnittlich hohe Alkaloidbildung aufwiesen.

Ausgangsstamm: 120 mg/l

Stamm	Trocken- gewicht (g/l)	Serpentin (mg/l)	Ajalacin (mg/l)	Tetrahydro- alstonin (mg/l)	Summe (mg/l)
M 36-2	16.6	66.5	160.3	54.4	282.2
M 18-1	18.8	65.2	213.4	35.6	314.2
M 24-3	17.4	61.2	134.0	51.7	246.9
M 6-1	24.8	36.2	4.2	287.9	328.3
M 36-1	21.4	80.6	163.0	66.0	309.6
M 23-2	21.0	117.4	138.3	34.1	289.9
M 17-1	21.9	280.8	23.7	9.9	314.4

als 200 mg/l (um 170 %) übertraf. Auffallend war bei den hier aufgeführten Stämmen, daß sie in der Regulation zur Bildung der einzelnen Alkaloide stark variierten. Während Stamm M 18-1 in erster Linie Ajmalicin gebildet hatte, war in Stamm M 17-1 Serpentin besonders hoch angereichert worden. Stamm M 6-1 hatte bevorzugt Tetrahydroalstonin gebildet und mit einem Gehalt von 287,9 mg/l alle anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellstämme bei weitem übertroffen.

Die in Tabelle 12 aufgeführten Gehalte waren mit Suspensionskulturen erzielt worden, die in Produktionsmedium in Abwesenheit des Hemmstoffes kultiviert worden waren. Zellstämme, die von Methyltryptophan-Medium selektiert worden waren, wurden nach mehreren Passagen in Hemmstofffreiem Medium als Suspensionskulturen erneut in Produktionsmedium unter Zugabe von Methyltryptophan (5×10^{-5} M) kultiviert. Nach 14tägigem Wachstum wurde das Gewebe extrahiert und die Alkaloidbildung unter dem Einfluß des Hemmstoffes untersucht (Tabelle 13).

Auch nach mehreren Passagen in Medium ohne Methyltryptophan hatte sich die Resistenz der selektierten Zellen erhalten. Wurden sie erneut in Medium übertragen, das die gleiche Methyltryptophankonzentration wie das zur Selektion verwendete Medium gehabt hatte, waren sie nicht nur zu normalem Wachstum, sondern gleichzeitig auch zu überdurchschnittlicher Alkaloidbildung fähig.

Diese Stabilität der Resistenz auch in Abwesenheit des Hemmstoffes könnte ein Hinweis sein, daß es sich bei den hier selektierten Stämmen wirklich um Mutanten gehandelt hatte. Auch die geringe Frequenz (8×10^{-6}), mit der die resistenten Kolonien auftraten, deutet darauf hin, daß der Resistenz dieser Stämme eine Mutation zugrunde liegt.

Tabelle 13: Von 5-Methyltryptophan-Medium selektierte Zellstämme von *Catharanthus roseus*, die als Suspensionskulturen bei Zugabe von 5-Methyltryptophan (5×10^{-5} M) zum Produktionsmedium während 14tägiger Kultivierung erhöhte Alkaloidbildung zeigten.

* Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin.

Stamm	Trockengewicht (g/l)	Alkaloide * (mg/l)
M 7	22.4	146.0
M 11	24.8	127.5
M 15	27.6	194.1
M 17	21.9	314.4
M 20	23.0	132.6
M 24	25.4	189.9

Das Auffinden dieser Regulationsmutanten war durch Kombination zweier Selektionsmethoden ermöglicht worden. Durch den ersten Selektionsschritt, der Behandlung einer Zellpopulation mit 5-Methyltryptophan, wurden die resistenten Stämme isoliert. Mit Hilfe der neuentwickelten optischen Selektionsmethode konnten daraufhin unter den resistenten Stämmen hochproduzierende Zellkolonien aufgrund ihrer intensiven Fluoreszenz ausgesondert werden, aus denen Zellstämme mit deutlich erhöhter Alkaloidproduktion angelegt werden konnten.

6. Chromosomenuntersuchungen an varianten Zellstämmen von *Catharanthus roseus*

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, daß kultivierte pflanzliche Zellen bei der Produktion ihrer Inhaltsstoffe extrem variieren können, selbst wenn es sich dabei um Zellen einer Population handelt, die zudem unter den gleichen Bedingungen kultiviert werden. Zellkolonien mit verschiedenen biochemischen Charakteristika konnten aus ein und derselben Ausgangskultur isoliert werden. Aus ihnen wurden Zellstämme etabliert, die sowohl im Muster als auch in der Menge der gebildeten Sekundärstoffe deutliche Unterschiede aufwiesen. Durch Selektion wurden sie "aus dem pool der genetischen Variationen, die innerhalb einer Population somatischer Zellen vorhanden sind" (BLAKELY und STEWARD, 1964) herausgesucht. Ob für das Auftreten solcher Variationen Genmutationen, Chromosomenaberrationen oder auch andere genetische oder epigenetische Vorgänge verantwortlich sind, ist bisher noch unbekannt.

Ein Phänomen, das häufig im Lauf der Kultivierung pflanzlicher Zellen beobachtet werden konnte, ist die Instabilität von Chromosomenzahl und -struktur (MELCHERS und BERGMANN, 1958; MITRA und STEWARD, 1961; BAYLISS, 1973; SINGH und HARVEY, 1975 a, 1975 b). Sogar an Zellklonen, die sich durch Teilung einer Einzelzelle entwickeln, konnte bereits nach 8 - 10tägiger Kultivierung Polyploidisierung einiger Zellen beobachtet werden (COOPER et al., 1964).

Kalluskulturen von Haplopappus gracilis haben sich als besonders geeignet erwiesen, um chromosomale Veränderungen in kultivierten Zellen zu studieren (MITRA und STEWARD, 1961), da dieses Objekt eine sehr kleine Chromosomenzahl besitzt (4 in diploiden Zellen) und jedes Chro-

mosom durch eine charakteristische Form gekennzeichnet ist. So konnte beobachtet werden, daß das Auftreten verschiedener Ploidisierungsgrade mit den Veränderungen des Gesamtstickstoffgehaltes im Gewebe einherging (BLAKELEY und STEWARD, 1964).

Die Änderungen der Chromosomenzahl beruhen nicht nur auf der Vervielfältigung ganzer Chromosomensätze. Durch fehlerhafte Mitosen können Zellen entstehen, in denen einzelne Chromosomen überzählig sind oder fehlen. Die Chromosomen selbst können morphologisch verändert werden. Diese Chromosomenaberrationen können vielfache Ursachen haben, so wurden an Präparaten von Haplopappus-Kalluszellen u.a., Somatische Paarung, Pseudochiasmen, Chromatidenbrüche oder Fragmentation von Chromosomen festgestellt (MITRA und STEWARD, 1961).

Das abweichende Verhalten kultivierter Zellen steht im Gegensatz zu der typischen und konstanten Chromosomenzahl in Zellen der differenzierten Pflanze (BRESCH und HAUSMANN, 1970). Es wurde vermutet, daß Substanzen im Kulturmedium für die chromosomalen Veränderungen der Zellen verantwortlich sind (SINGH und HARVEY, 1975 a, 1975 b). Medien für pflanzliche Zellkulturen enthalten normalerweise 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure als Wachstumsregulator. 2,4-D kann in hohen Konzentrationen die Spindelbildung bei der Mitose differenzierter Pflanzen beeinflussen (CROCKER, 1953) und so unregelmäßige Zellteilungen herbeiführen. Daher wurde angenommen, daß diese Substanz auch zu Chromosomeninstabilität kultivierter Pflanzenzellen führen kann. Kalluskulturen von Antirrhinum majus, die von einer haploiden Pflanze angelegt worden waren, wiesen auf Indolessigsäure-haltigem Medium nur haploide Mitosen auf. Wurde das Gewebe auf 2,4-D haltiges Medium übertragen, konnten bereits nach fünf weiteren

Passagen höhere Chromosomenzahlen festgestellt werden (MELCHERS und BERGMANN, 1958). Offensichtlich hatte der Wuchsstoff die Polyploidisierung der Zellen herbeigeführt.

An Kalluskulturen von Vicia hajastana wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen von 2,4-D auf das cyto-genetische Verhalten der Zellen untersucht (SINGH und HARVEY, 1975 a). Dabei zeigte sich, daß die Frequenz, mit der Anaphasenanomalien auftraten, negativ korreliert war mit der Konzentration von 2,4-D im Medium. Während der Kultivierung von Haplopappus gracilis Zellen in Medium, das Kokosmilch und/oder 2,4-D oder Naphthyllessigsäure enthielt, traten Veränderungen der Zellzahl durch Polyploidie oder mehrkernige Zellen auf. Außerdem konnten in der Anaphase Anomalien wie Chromatid- oder Chromosomenbrüche, dicentrische Chromosomen, Pseudochiasmata oder Änderungen der Chromosomengestalten festgestellt werden (MITRA und STEWARD, 1961). Sind solche aberranten Zellen in der Kultur zu weiteren Teilungen fähig, können sie sich zu Zellstämmen mit einer genetischen Konstitution entwickeln, die von der des Ursprungsgewebes verschieden ist, und somit für das Auftreten varianter Zellstämmen in einer Population verantwortlich sein kann.

Chromosomenuntersuchungen kultivierter Zellen können daher auch wichtige Hinweise auf die genetischen Grundlagen geben, die eventuell für die sehr unterschiedliche Produktion von Inhaltsstoffen bei varianten Zellstämmen verantwortlich sind.

Suspensionskulturen verschiedener Stämme von Catharanthus roseus, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultiviert worden waren, wuchsen über mehr als 70 Passagen in Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965), das als Wachstumsregu-

latoren 10^{-6} M, 2,4-D und 10^{-6} M Naphthylessigsäure enthielt. Wurden Zellen dieser Stämme in das für die Alkaloidbildung optimierte Produktionsmedium (ZENK et al., 1977) übertragen, konnte nach 14tägiger Kultivierung sehr unterschiedliche Anreicherung von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin festgestellt werden. Stämme mit hoher Alkaloidbildung hatten etwa 10 - 15mal soviel der untersuchten Inhaltsstoffe angereichert wie Gewebe niedrig produzierender Zellstämme. Da diese Stämme seit mehr als zwei Jahren kontinuierlich dem Einfluß von 2,4-D ausgesetzt waren, sollte überprüft werden, wie sich die Kultivierungsdauer auf die Zellen von Catharanthus roseus ausgewirkt hatte. Dabei sollten eventuell auftretende numerische Chromosomenveränderungen erfaßt werden und mit der Chromosomenzahl der differenzierten Pflanze verglichen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Alkaloidbildung der Zellstämme auf verschiedene Chromosomenzahlen der Zellen zurückzuführen ist.

Für die Chromosomenuntersuchungen wurden Suspensionskulturen von hoch und niedrig produzierenden Stämmen von Catharanthus roseus 8 Tage kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt hatte das exponentielle Wachstum eingesetzt, die Zellen befanden sich also im Stadium ihrer maximalen Teilungsaktivität. Um möglichst viele sich teilende Zellen zu erfassen, wurden die Gewebe am 9. Tag geerntet und die Zellen, wie in Kapitel II.5.4. beschrieben, fixiert und gefärbt. Daraufhin wurden Quetschpräparate hergestellt und von Zellen, die sich in der mitotischen Metaphase befanden, die Chromosomenzahlen ermittelt. Von jedem der untersuchten Zellstämme wurden dabei die Chromosomen von je 40 Zellen gezählt. Zur Bestimmung der Chromosomenzahl der differenzierten Pflanze wurden Wurzelspitzenpräparate einer jungen Catharanthus-Pflanze (6 Wochen alt) angefertigt. Dafür wurden die Spitzen der

Wurzeln abgetrennt, in Wasser gewaschen und etwa 30 Minuten mit Carminessigsäurelösung behandelt. Anschließend wurden an Hand von Quetschpräparaten die Chromosomenzahl in 40 Wurzelspitzenzellen bestimmt.

Aus Abbildung 16 A und B geht hervor, daß zwischen den Zellen des Wurzelspitzenmeristems (16 A) und Zellen der Suspensionskulturen (16 B) ein deutlicher Unterschied in der Zahl der Chromosomen bestand. Bei der Untersuchung des Wurzelspitzenmeristems wurde in 60 % aller ausgezählten Zellen die für Catharanthus roseus charakteristische Chromosomenzahl von $2n = 16$ gefunden (vgl. STEARN, 1975). In 28 % aller Zellen wurden 15 oder 17 Chromosomen gezählt. Diese Abweichungen lassen sich eventuell auf Artefakte oder Überlagerung von Chromosomen in den Präparaten zurückführen. Nur eine einzige der Zellen des Wurzelspitzenmeristems enthielt 8 Chromosomen, sie war also haploid.

Zellen aus Suspensionskulturen der hier untersuchten Stämme besaßen wesentlich mehr Chromosomen, als es für eine normale diploide Zelle charakteristisch ist. Die in Abbildung 16 B gezeigte Zelle des Stammes 58 war mit 48 Chromosomen hexaploid. Von allen ausgezählten Zellen (200) der untersuchten fünf Stämme waren nur 4, also 0,5 %, diploid. Das ursprünglich diploide Gewebe, das zur Anlage dieser Zellkulturen verwendet worden war, hatte im Laufe der zweijährigen Kultivierung wesentliche Veränderungen hinsichtlich der Chromosomenzahl seiner Zellen erfahren. Die Vervielfältigung ganzer Chromosomensätze konnte nur mit geringer Häufigkeit (12,5 %) beobachtet werden, während bei allen anderen Zellen unregelmäßige Vervielfältigung einzelner Chromosomen stattgefunden haben mußte.

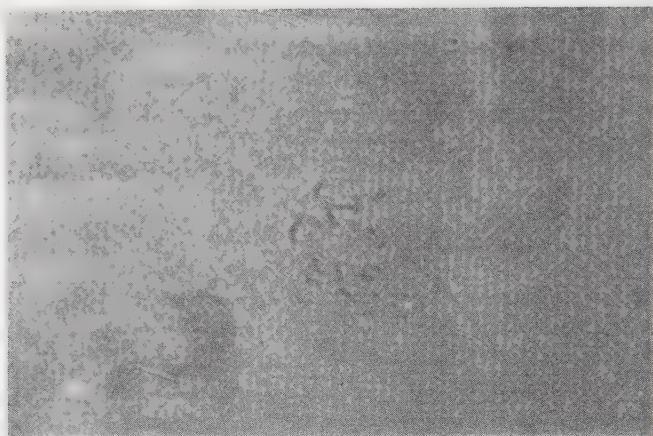


Abb. 16 A: Präparat einer Wurzelspitzenzelle von
Catharanthus roseus mit $2n = 16$ Chromosomen.

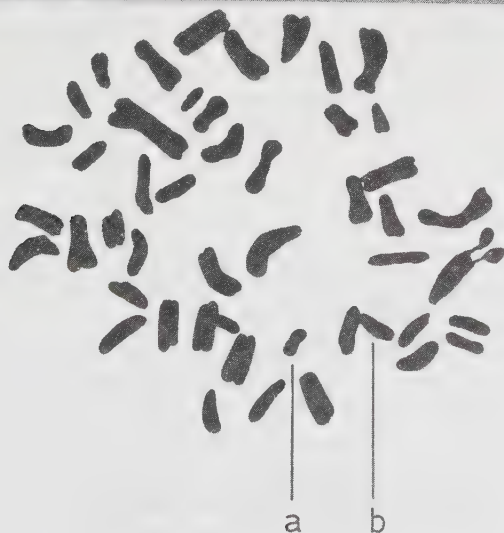
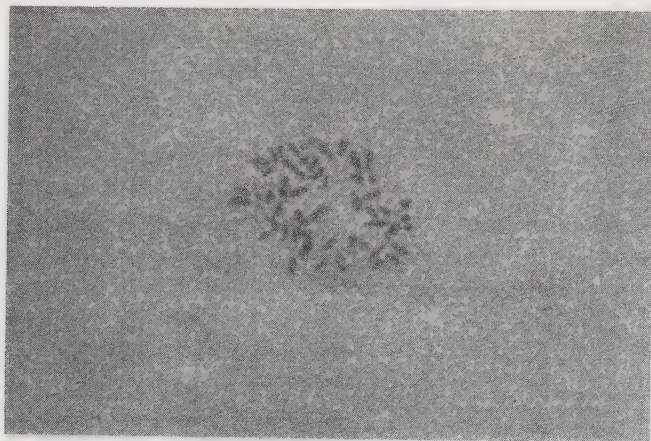


Abb. 16 B: Präparat einer Zelle aus einer Suspensionskultur von Catharanthus roseus mit $6n = 48$ Chromosomen.

a + b: Chromosomenfragmente oder kleine Chromosomen.

Die Zelle mit der höchsten Chromosomenzahl, die während dieser Untersuchungen ausgezählt wurde, war mit 81 Chromosomen mehr als decaploid ($10n$) gewesen.

Die Struktur der Chromosomen in kultivierten Zellen unterschied sich z.T. von denen aus Wurzelspitzenzellen. Vielfach konnten sehr kleine Chromosomen beobachtet werden (Abbildung 16 A, a + b), die aber auch durch Fragmentation großer Chromosomen entstanden sein könnten.

In Abbildung 17 A und B sind die Häufigkeitsverteilungen der Chromosomenzahlen von Wurzelspitzenzellen und Zellen aus Suspensionskulturen varianter Stämme von Catharanthus roseus dargestellt. Auch hier werden die konstante Chromosomenzahl des differenzierten Wurzelgewebes und die numerischen Anomalien der Chromosomen kultivierter Zellen ersichtlich. Das Gewebe dieser Stämme variierte sehr in der Höhe der enthaltenen Alkaloide (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin). Wenig Alkaloide hatten Stamm 65 (20 mg/l) und Stamm 58 (13 mg/l) gebildet, während Stamm 49 (123 mg/l), Stamm 3/62 (125 mg/l) und Stamm 36 (169 mg/l) zu den gut produzierenden Zellstämmen gehörten. Vergleicht man die Produktionsfähigkeit der Zellstämme mit den Chromosomenzahlen ihrer Zellen, fällt bei den gut produzierenden Stämmen 3/62, 36 und 49 eine Tendenz zu niedrigen Chromosomenzahlen auf. Die Zellen von Stamm 36 (169 mg/l) wiesen hauptsächlich Chromosomenzahlen auf, die sich auf den Bereich haploider bis tetraploider Chromosomensätze verteilten. Stamm 3/62 (125 mg/l) enthielt vorwiegend Zellen mit der drei- bis vierfachen Chromosomenzahl einer haploiden Zelle, und auch bei Stamm 49 (123 mg/l) konnten nur wenige Zellen festgestellt werden, deren Chromosomenzahlen deutlich höher als bei tetraploiden Zellen waren. Bei diesem Stamm verteilte sich die Anzahl der Chromosomen pro Zelle auf den Bereich zwischen diploider und tetraploider Chromosomenzahl.

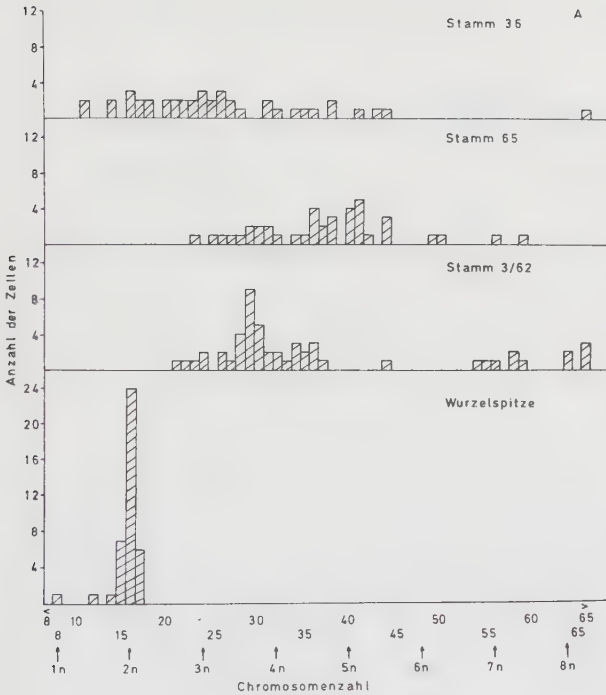
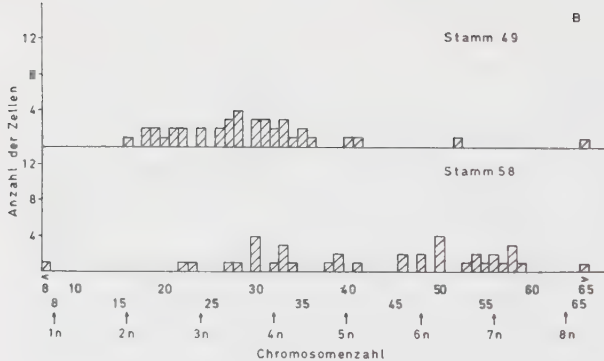


Abb. 17 A und B: Die Häufigkeitsverteilungen der Chromosomenzahlen von Wurzelspitzenzellen und Zellen aus Suspensionskulturen varianter Stämme von *Catharanthus roseus*.



Bei dem wenig Alkaloide produzierenden Stamm 58 (13 mg/l) waren deutlich mehr Zellen vorhanden, deren Chromosomenzahlen etwa dem sechs- oder siebenfachen des haploiden Satzes entsprachen. Der zweite Stamm mit niedrigem Alkaloidgehalt, Stamm 65 (20 mg/l) enthielt vermehrt Zellen mit etwa der fünffachen Chromosomenzahl einer haploiden Zelle. Bei beiden wenig Alkaloide bildenden Zellstämmen waren also mehr Zellen mit außergewöhnlich hoher Chromosomenzahl vertreten, als es bei den überdurchschnittlich gut produzierenden Stämmen der Fall gewesen war.

Bei den hier dargestellten Ergebnissen deutet sich also an, daß die Alkaloidgehalte der varianten Zellstämmen negativ korreliert sind mit der Anzahl der Chromosomen

ihrer Zellen. Zellstämme, deren Chromosomenzahl wenig von der Anzahl des diploiden Satzes abweichen, sind offensichtlich zu höherer Alkaloidakkumulation fähig als Zellstämme, deren Chromosomenzahl drastisch vom normalen diploiden Chromosomensatz differieren.

Auf dem Gebiet der Züchtungsforschung wird häufig die Methode der künstlichen Polyploidisierung angewendet, um den landwirtschaftlichen Ertrag von Nutzpflanzen zu steigern (BRESCH und HAUSMANN, 1970). Dabei wurde festgestellt, daß z.B. das Wachstumsoptimum polyploider Pflanzen nicht immer durch die höchsten Ploidiewerte erzielt werden kann. Tetraploide Pflanzen sind häufig Triploiden unterlegen. Ob ein ähnliches Phänomen auch bei der Naturstoffbildung pflanzlicher Zellkulturen auftritt, kann erst durch detailliertere Untersuchungen an einer größeren Anzahl varianter Zellstämme entschieden werden. Die Beobachtung, die an den oben beschriebenen Stämmen gemacht werden konnten, können nur als Hinweise darauf gewertet werden, daß sich höhere Ploidisierung der Zellen negativ auf die Alkaloidgehalte der Zellkulturen auswirken. Theoretisch könnte man erwarten, daß eher umgekehrt erst durch Vervielfältigung der Chromosomen eine deutlich geförderte Alkaloidbildung möglich ist. Liegen vermehrt Chromosomen in der Zelle vor, wären damit auch die Gene zur Codierung der Enzyme vervielfältigt, die für die Biosynthese der Zellinhaltsstoffe zuständig sind, so daß ein gesteigerter Sekundärstoffgehalt erwartet werden könnte. Dies war aber bei den hier untersuchten Zellstämmen nur in begrenztem Maße der Fall. Zudem waren hier nicht ganze Chromosomensätze überzählig, die Zellen waren überwiegend aneuploid, so daß nicht generell damit gerechnet werden kann, daß die für die Alkaloidsynthese verantwortlichen Gene vermehrt in den Zellen vorhanden waren. Zudem könnten auch Gene verstärkt vertreten sein, die für die Metabolisierung

der Inhaltsstoffe zuständig sind, so daß sich dadurch eine erhöhte Chromosomenzahl negativ auf die Naturstoffgehalte der Zellkulturen auswirken würde.

Die Zellen der intakten Pflanzen wiesen keine starken Abweichungen vom normalen diploiden Chromosomensatz auf. Man kann daher ausschließen, daß sich die untersuchten Zellstämme aus bereits polyploiden Zellen des differenzierten Gewebes gebildet hatten. Zellen mit aberranten Chromosomenzahlen können sich also erst während der Kultivierung der Zellen als Kallus- und Suspensionskulturen entwickelt haben.

7. Stoffwechselleistungen immobilisierter Pflanzenzellen

Die bereits beschriebenen Untersuchungen an pflanzlichen Zellkulturen zeigen, daß es durch Anwendung geeigneter Selektionsmethoden gelingt, Zellstämme mit gesteigerter Fähigkeit zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe zu etablieren. Durch Zugabe von Vorstufen ließ sich die Sekundärstoffproduktion weiterhin positiv beeinflussen. Solche Zellstämme, unter geeigneten Bedingungen kultiviert, sind besonders im Hinblick auf die biotechnologische Nutzung pflanzlicher Gewebekulturen interessant.

Bei der Naturstoffproduktion im großen Maßstab haben aber pflanzliche Zellen gegenüber Mikroorganismen einen wesentlichen Nachteil. Das Volumen einer Pflanzenzelle ist etwa 200 000 mal größer als das einer Bakterienzelle; Tranferprozesse und Zellmetabolismus spielen sich daher wesentlich langsamer ab (ZENK, 1978 a). Die Produktion von Biomasse und parallel dazu die Synthese der Naturstoffe beanspruchen also bei Fermenterkulturen von Pflan-

zenzellen wesentlich mehr Zeit, als es bei Bakterien der Fall ist. Daher wären Methoden erstrebenswert, die es ermöglichen, das biochemische Potential einer langsam wachsenden Pflanzenzelle effektiver für die Bildung ihrer Inhaltsstoffe auszunutzen.

Eine in dieser Hinsicht interessante, in der Biotechnologie entwickelte und bereits erprobte Technik, die Immobilisierungsmethode, wurde zuerst an gereinigten Enzymen angewendet. Die Proteinmoleküle können dabei auf verschiedene Weise immobilisiert werden, sie können an ein unlösliches Trägermaterial (Stärke, Ionenaustauscherharze) adsorbiert werden, durch Polymerisation von Monomeren gebunden werden, durch Derivatisierung mit langen Polyaminoketten ausgefällt werden oder kovalent an eine unlösliche Matrix gebunden werden (SRERE und UYEDA, 1976). Die so behandelten Enzyme haben sich als wesentlich stabiler gegenüber Denaturierung erwiesen (MOSBACH, 1976). Diese Eigenschaft ist ein bedeutender Vorteil für die biotechnologische Nutzung der Enzyme zur Produktion von Naturstoffen, besonders wenn die Produktion im kontinuierlichen Verfahren in Bioreaktoren durchgeführt werden soll.

Gerade unter diesem Aspekt ist auch der Einschluß ganzer mikrobieller Zellen zunehmend interessant geworden. Durch diese Methode erübrigt sich das oft schwierige Extraktions- und Reinigungsverfahren der gewünschten Enzyme. Multienzymkomplexe, die einen unbeeinträchtigten Zellmetabolismus auch zur Regeneration von Cofaktoren benötigen, können als Ganzes erhalten bleiben, vorausgesetzt, daß die Immobilisierungsmethode selbst keinen denaturierenden Einfluß ausübt. Durch ihre natürliche zelluläre Umgebung werden besonders labile Enzyme bei dem Einschluß ganzer Zellen vor chemischen oder physikalischen Einflüssen geschützt (CHEETHAM et al., 1979).

Immobilisierte Mikroorganismen konnten bereits erfolgreich zur Produktion von Naturstoffen, auch im industriellen Maßstab, eingesetzt werden. So wurde an Escherichia coli Zellen, die in einem Polyacrylamid Gel eingebettet worden waren, die Bildung von L-Tryptophan durch das Enzym Tryptophanase (AZERAD et al., 1980) erreicht. Dabei erwies sich das in den immobilisierten Zellen erhaltene Enzym sehr viel unempfindlicher gegenüber Substrathemmung durch Indol, als es die gereinigte Tryptophanase war. Die Synthese von L-Tryptophan durch immobilisierte Escherichia coli Zellen wurde optimal bei 2 - 3 mM Indolkonzentration durchgeführt, eine Substratkonzentration, bei der das isolierte und gereinigte Enzym bereits vollständig gehemmt wurde.

Die L-Tryptophanbildung durch immobilisierte Zellen wurde nicht nur im batch-Verfahren erprobt, sondern konnte auch im kontinuierlichen System durchgeführt werden. Dabei wurden die Substrate Ammoniak, Pyruvat und Indol fortlaufend durch eine Säule zirkuliert, die mit immobilisierten E. coli Zellen gefüllt war. Das gebildete L-Tryptophan wurde an einer in den Kreislauf eingeschlossenen Holzkohlen-Säule adsorbiert und abgefangen. Während 10stündiger Versuchsdauer wurden auf diese Weise 12 g L-Tryptophan von 3 g immobilisierten E. coli Zellen produziert (AZERAD et al., 1980).

Ein Prozeß, der bereits industriell genutzt wird, ist die Produktion von L-Asparaginsäure durch E. coli Zellen, die ebenfalls in Polyacrylamid eingeschlossen wurden (CHIBATA et al., 1976). Das für die Bildung von L-Asparaginsäure notwendige Enzym Aspartase war in vorhergehenden Experimenten gereinigt und ebenfalls in Polyacrylamid immobilisiert worden. Seine Aktivität und Stabilität hatten sich dabei als zu gering erwiesen, um die industrielle Anwendung lohnend zu machen. Erst durch Immobilisierung

ganzer Zellen wurde die Stabilität des Enzyms auch während langer Prozeßdauer (135 Tage) gewährleistet. So war es möglich, auch diese Enzymreaktion kontinuierlich in einem Reaktorsystem durchzuführen und in großem Maßstab zur Produktion von L-Asparaginsäure zu nutzen. Durch Verwendung von immobilisierten Zellen konnten dabei die Produktionskosten um 60 % gesenkt werden, verglichen mit den herkömmlichen batch- oder Fermentationsprozessen mit Hilfe von nicht eingeschlossenen Bakterien (CHIBATA et al., 1976).

Die bisher gebräuchlichste Methode zum Einschluß mikrobieller Zellen ist die Immobilisierung mit Polyacrylamidgelen. Die bei der Polymerisierung von Acrylamiden auftretende Wärmeentwicklung und die Bildung von freien Radikalen könnten sich aber negativ auf die Enzymaktivitäten der immobilisierten Zellen auswirken (CHEETHAM et al., 1979). Eine schonende Zell-Immobilisierung ist dagegen bei Verwendung von Na-Alginat als Einbettungsmaterial gewährleistet. Alginsäure stellt ein Gemisch aus β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure dar und wird aus Seetang (Macrocystis pyrifera) gewonnen. Dieses Naturprodukt wird hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel und in der pharmazeutischen Industrie als Emulgator und Bindemittel für Tabletten eingesetzt.

In der Gegenwart von Calcium-Ionen setzt die Polymerisation des Na-Alginates ein. Dabei werden die im Alginat enthaltenen Na-Ionen durch zugegebene Calcium-Ionen ersetzt und die Guluronsäure- und Mannuronsäurereste zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft, in dessen Zwischenräume Zellen eingeschlossen werden können (CHEETHAM et al., 1979). Mit dieser Methode konnten nicht nur Mikroorganismen (TAKATA et al., 1977), sondern, nach-

dem die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse veröffentlicht waren (BRODELIUS et al., 1979), auch sehr empfindliche tierische Zellen wie Erythrocyten (PILWAT et al., 1980) erfolgreich eingeschlossen und ihre biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert werden. Die gute Zellverträglichkeit des Na-Alginates schien eine günstige Voraussetzung, um es auch zur Immobilisierung pflanzlicher Zellen zu verwenden. Dabei sollte untersucht werden, ob sich das biochemische Potential pflanzlicher Zellen nach Einschluß in einer Matrix effektiver ausnutzen läßt, als es bei freisuspendierten Zellen einer Gewebekultur der Fall ist. An drei Modellsystemen wurden dabei verschiedene Aspekte der biosynthetischen Leistungen pflanzlicher Zellkulturen untersucht.

7.1. Indolalkaloidbildung aus applizierten Vorstufen

An immobilisierten Zellen von Catharanthus roseus wurde die Indolalkaloidsynthese nach Zugabe von Vorstufen untersucht. Das Gewebe des hier verwendeten Stammes produzierte als Suspension bei 14tägiger Kultivierung 96 mg Serpentin und Ajmalicin, war also zu durchschnittlicher Syntheseleistung fähig. Die Zellen wurden, wie in Kapitel II.11.1. beschrieben, im Alginatgel immobilisiert und die Polymerisate nach dem Reifungsprozeß in eine Säule geschichtet (vgl. Kapitel II.11.3.). Die Fähigkeit der immobilisierten Zellen zur Bildung des Indolalkaloids Ajmalicin aus den ihnen angebotenen Vorstufen Tryptamin und Secologanin wurde in einem kontinuierlichen Verfahren untersucht. Das Prinzip dieser Methode ist bereits in Kapitel II.11.3. beschrieben worden und soll an Hand der schematischen Darstellung in Abbildung 18 noch einmal erläutert werden.

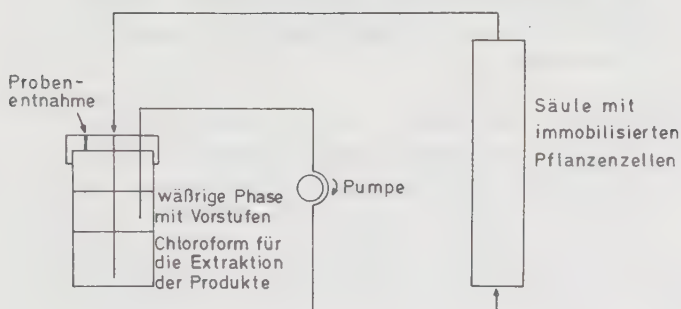


Abb. 18: Schematische Darstellung des Säulenverfahrens zur kontinuierlichen Indolalkaloidbildung durch immobilisierte *Catharanthus roseus* Zellen nach Applikation von Vorstufen.

In einem Vorratsgefäß befanden sich als untere Phase Chloroform und darüberschichtet als wäßrige Phase Kulturmedium, dem die Vorstufen (2-¹⁴C)-Tryptamin (25 µMol) und Secologanin (25 µMol) zugegeben worden waren. Mit Hilfe einer Pumpe wurde das Medium aus dem Vorratsgefäß von unten durch die Säule gepumpt, in der sich die immobilisierten Zellen befanden. Von der Säule kommend wurde das Medium in die Chloroformphase des Vorratsgefäßes geleitet. Dadurch wurde das Eluat der Säule kontinuierlich beim Durchperlen des Chloroforms extrahiert. Während der 90stündigen Reaktionszeit wurden

Proben aus der Chloroformphase entnommen, und die Bildung von radioaktiv markierten, chloroformextrahierbaren Substanzen verfolgt. Dabei wurde der Anteil der Radioaktivität in der Ajmalicingruppe und die Verteilung der Aktivität zwischen den Isomeren Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin chromatographisch ermittelt.

Aus Abbildung 19 geht hervor, daß die Vorstufe Tryptamin kontinuierlich verbraucht wurde, während chloro-

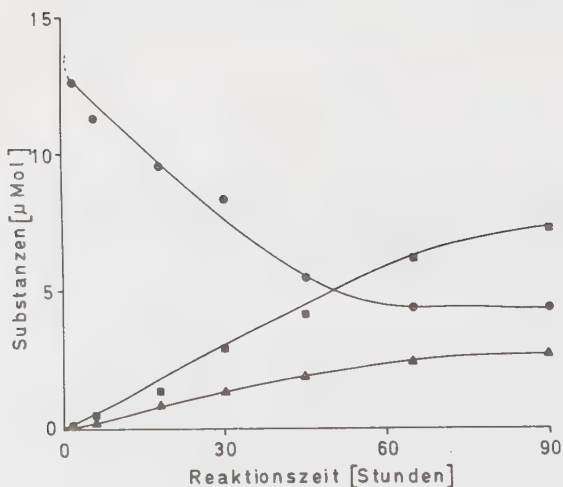


Abb. 19: Synthese von Indolalkaloiden der Ajmalicingruppe durch immobilisierte Zellen von *Catharanthus roseus*.

(●—●) Nicht umgesetztes Tryptamin in der wässrigen Phase; (■—■) umgesetztes Tryptamin in Form von chloroformextrahierbaren Substanzen; (▲—▲) Ajmalicin-Isomere in der Chloroformphase.

formextrahierbare Substanzen gebildet wurden. Nach 90stündiger Reaktionszeit waren etwa 30 % der angegebenen Vorstufe Tryptamin von den Zellen umgesetzt worden, und ein Drittel der in der Chloroformphase enthaltenen markierten Substanzen entsprach den gebildeten Ajmalicin-Isomeren. Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin waren dabei im Verhältnis 15:4:6 gebildet worden.

Die Bildung dieser Ajmalicin-Isomere aus den Vorstufen Tryptamin und Secologanin konnte bereits im zellfreien System nachgewiesen werden (STÖCKIGT et al., 1976); allerdings mußten diesem System Reduktionsäquivalente in Form von NADPH zugegeben werden, um das Zwischenprodukt Cathenamin in Ajmalicin zu überführen (STÖCKIGT et al., 1977).

NADPH war den immobilisierten Zellen nicht zugegeben worden, trotzdem war die Ausbeute an Alkaloiden verhältnismäßig hoch. Es ist daher anzunehmen, daß der endogen enthaltene Cofaktor NADPH in den immobilisierten Zellen regeneriert worden ist.

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen waren die Inhaltsstoffe von den Zellen in das Medium abgegeben worden. Unter normalen Kulturbedingungen werden die Sekundärstoffe nicht ausgeschieden, sondern in der Vakuole der Zellen deponiert (ZENK, 1978 a). Ursache für den hier beschriebenen Effekt könnten Änderungen der Membranpermeabilität sein, die durch Spuren von Chloroform im Medium hervorgerufen wurden. Die Permeabilitätsänderung und die damit verbundene Abgabe der Inhaltsstoffe aus den Zellen in das Medium sind besonders interessant im Hinblick auf die biotechnologische Nutzung immobilisierter Pflanzenzellen zur Produktion von Naturstoffen.

Die Untersuchungen an immobilisierten Zellen von Catharanthus roseus wurden in Zusammenarbeit mit Dr. P. Brodelius, Universität Lund, Schweden, durchgeführt.

7.2. De novo-Synthese von Anthrachinonen

Zellen von Morinda citrifolia sind unter geeigneten Kulturbedingungen auch ohne Zugabe externer Vorstufen zur Synthese von Anthrachinonglykosiden fähig (ZENK et al., 1975). Zellen von Morinda citrifolia wurden daher ausgewählt, um den Einfluß der Immobilisierung auf die de novo-Synthese eines pflanzlichen Inhaltsstoffes zu untersuchen. Da die hier untersuchten Naturstoffe intensiv gelb gefärbt sind, konnte die Anreicherung der Anthrachinonglykoside bereits während der Kultivierung optisch verfolgt werden.

Die in den Alginatkugeln eingeschlossenen Zellen wurden in dem Medium nach GAMBORG et al. (1968) ohne Zugabe von Hormonen unter sterilen Bedingungen in Erlenmeyerkolben auf dem Rotationsschüttler kultiviert (vgl. Kapitel II.11.2.). Parallel dazu wurden frei suspendierte Morinda-Zellen unter den gleichen Bedingungen gehalten. Die Abwesenheit der Hormone hatte dabei zweierlei Effekt. Einerseits wurde das Wachstum der Zellen gehemmt, so daß ein Sprengen der Kugeln durch die sich teilenden Zellen verhindert wurde. Andererseits war die Anthrachinonbildung pro Zelle in Medium ohne Hormone erhöht, vergleicht man sie mit der frei wachsender Zellen im kompletten Medium.

Die Anthrachinonbildung freier und in Alginatkugeln eingeschlossener Zellen wurde über einen Zeitraum von 24 Tagen verfolgt. Zur Bestimmung des Anthrachinongehal-

tes immobilisierter Zellen wurden die Alginatkugeln eines Kolbens vom Medium getrennt, mit Wasser gewaschen und danach in 25 ml heißem 80 %igem Äthanol unter Rückflußkühlung 30 Minuten extrahiert. Danach wurden die Kugeln vom Extrakt getrennt und der Anthrachinongehalt der Extrakte photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel II.3.3.4.). Proben der frei suspendierten Zellen wurden nach dem Abfiltrieren des Mediums ebenfalls alkoholisch extrahiert und entsprechend analysiert. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Alginatkugel wurden die Polymerisate durch Zugabe von Phosphatpuffern (1 M) aufgelöst. Die danach freigesetzten Zellen konnten, wie die Proben der Zellsuspensionen, in einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

In Abbildung 20 A und B ist das Wachstum und die Anthrachinonbildung freier und in Alginatgel immobilisierter Zellen während einer 24tägigen Kultivierung dargestellt. Nach einer lag-Phase von 8 Tagen nahm der Anthrachinongehalt pro Zelle in immobilisierten Zellen (Abbildung 20 A) drastisch zu und erreichte am 24. Tag etwa den 10fachen Gehalt der frei suspendierten Zellen. Das Wachstum der eingeschlossenen Zellen war gegenüber dem der freien Zellen deutlich gehemmt (Abbildung 20 B). Unter den gleichen Kulturbedingungen nahm aber der Anthrachinongehalt pro frei suspendierte Zelle nur unwesentlich zu. Offensichtlich wurden die biochemischen Fähigkeiten der eingeschlossenen Zellen nach Hemmung des Wachstums vermehrt zur Bildung der Sekundärstoffe eingesetzt. Daß die Wachstumshemmung der immobilisierten Zellen nicht auf ein erhöhtes Absterben von Zellen im Alginatgel zurückzuführen ist, konnte durch Plasmolyseexperimente an wieder aus dem Gel gelösten Zellen bewiesen werden. Auch nach 24tägiger Kultivierung der Alginatkugeln waren die enthaltenen Zellen nach Zugabe einer hypertonischen Glycerinlösung plasmolysierbar. Absterben

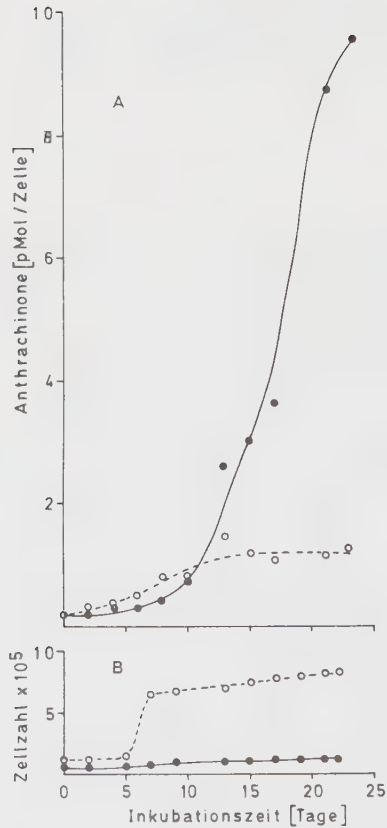


Abb. 20: (A) Die *de novo*-Synthese von Anthrachinonen durch *Morinda citrifolia* Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
(B) Die zeitabhängige Zunahme der Zellzahl pro ml für freie Zellen und pro Kugel für immobilisierte Zellen.

(○—○) freie Zellen; (●—●) immobilisierte Zellen.

der Zellen würde zum sofortigen Verlust der Semipermeabilität des Protoplasten führen und somit auch zum Verlust ihrer Plasmolysierbarkeit, die man deshalb als Kriterium für den Lebenszustand der Zelle verwenden kann (NULTSCH, 1971).

Nach Immobilisierung in Alginatgel konnte die de novo-Synthese von Anthrachinonen durch Morinda-Zellen über einen Zeitraum von 24 Tagen fortgeführt werden. Eingeschlossene Zellen hatten unter diesen Bedingungen wesentlich mehr Anthrachinone akkumuliert, als es bei frei wachsenden Zellen der Fall gewesen war. Ob diese gesteigerte de novo-Synthese ein Effekt der Immobilisierung selbst ist, kann allein durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse noch nicht geklärt werden. Möglicherweise hat auch der enge Kontakt der eingeschlossenen Zellen zueinander zu einer Förderung der Sekundärstoffbildung beigetragen.

7.3. Biotransformation

Frei suspendierte Zellen von Digitalis lanata sind in geeignetem Medium fähig, extern zugegebenes Digitoxin durch 12 β -Hydroxylierung in das pharmazeutisch wichtige Digoxin zu transformieren (REINHARD et al., 1975). Dies ist insofern von praktischer Bedeutung, als auf diese Weise das bei Aufarbeitung der Blattdroge anfallende Digitoxin in das wertvollere Digoxin umgewandelt werden kann. Das in den kultivierten Zellen gebildete Digoxin wurde in das Kulturmedium ausgeschieden (WEILER, 1977 a).

Zellen von Digitalis lanata Stamm GÖ 20 W wurden in Alginatkugeln eingeschlossen, um an ihnen den Einfluß der Immobilisierung auf die Biotransformation eines Natur-

stoffes zu untersuchen. Die Immobilisierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und je 30 Kugeln mit eingeschlossenen Zellen in 25 ml Medium (NITSCH und NITSCH, 1969) auf dem Rotationsschüttler kultiviert. Zuvor war zu je 25 ml Medium 500 µg Digitoxin in 0.5 ml 96 % Äthanol gelöst zugefügt worden. Während der 33tägigen Kultivierung wurden unter aseptischen Bedingungen Proben (0.2 ml) des Mediums entnommen und bis zur Analyse mit dem Radioimmunoassay tiefgefroren. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen immobilisierte Digitalis-Zellen (30 Kugeln) in Medium ohne Zusatz von Digitoxin unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden.

Aus Abbildung 21 geht hervor, daß die Transformationsfähigkeit der Zellen nicht negativ durch den Einschluß in das Alginatgel beeinflußt worden war. Bereits nach 7tägiger Kultivierung konnte eine deutliche Zunahme von Digoxin im Medium nachgewiesen werden. Der Gehalt des Transformationsproduktes im Medium stieg im Laufe der 33tägigen Versuchsdauer kontinuierlich an. Die Menge des Digoxins, das von den eingeschlossenen Zellen gebildet worden war, entsprach etwa der Produktbildung frei suspendierter Zellen des gleichen Stammes (WEILER, 1977 a). Bemerkenswert ist dabei, daß das Produkt der immobilisierten Zellen sehr viel früher im Medium erschien als bei frei wachsenden Zellen. Eine deutliche Zunahme des Digoxingehaltes im Medium konnte bei immobilisierten Zellen bereits am 7. Tag festgestellt werden. Bei frei wachsenden Zellen kam es erst bei Erreichen der stationären Wachstumsphase am 17. Tag zur Akkumulation des Transformationsproduktes im Medium (WEILER, 1977 a). Die Verkürzung der lag-Phase bis zur Anreicherung des Digoxins im Medium ist besonders unter dem Aspekt der biotechnologischen Nutzung dieser Methode interessant. Durch Verkürzen der lag-Phase bis zur Produkt-

akkumulation könnten biotechnologische Prozesse ökonomischer gestaltet werden und damit zur effektiven Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellen beitragen.

Daß die Digoxinbildung immobilisierter Zellen nicht auf eine de novo-Synthese zurückzuführen ist, konnte mit Hilfe der Kontrollansätze bewiesen werden. Immobilisierte Zellen, die in Medium ohne Digitoxin inkubiert worden waren, hatten kein Digoxin gebildet (Abbildung 21). Die Digoxinbildung nach Zugabe von Digitoxin war also auf Biotransformation durch die immobilisierten Zellen zurückzuführen.

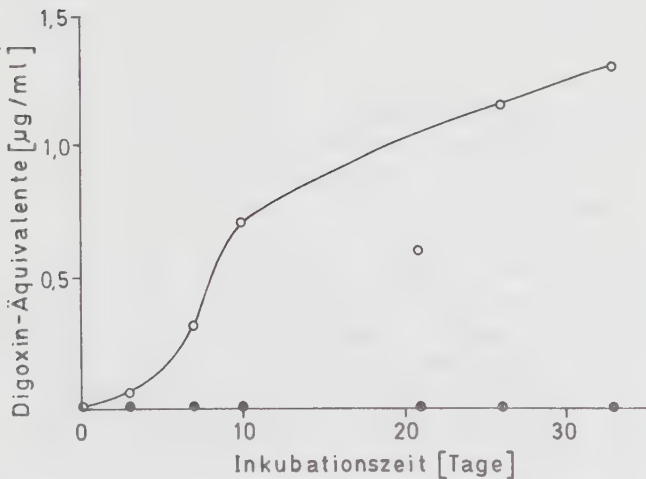


Abb. 21: Biotransformation von Digitoxin zu Digoxin durch immobilisierte Zellen von *Digitalis lanata* in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

(○—○) mit Zugabe von Digitoxin; (●—●) ohne Zugabe von Digitoxin.

An den zuvor beschriebenen Ergebnissen wird deutlich, daß die Immobilisierung pflanzlicher Zellen mit der hier verwendeten Alginatmethode gleichermaßen durchführbar ist, wie es an Mikroorganismen bereits erprobt wurde (TAKATA et al., 1978; CHEETHAM et al., 1979). Die metabolische Aktivität der Zellen, sei es für die de novo-Synthese ihrer Inhaltsstoffe, für die Bildung von Sekundärstoffen aus angebotenen Vorstufen oder für die Biotransformation einer applizierten Substanz, war unter dem Einfluß des Alginatgels vollständig, auch über einen längeren Zeitraum, erhalten geblieben. Dabei konnten einige positive Effekte beobachtet werden. So wurde die Anthrachinonbildung in immobilisierten Morinda citrifolia Zellen um etwa das 10fache gegenüber der Produktbildung frei suspendierter Zellen gesteigert. Die Alkaloidsynthese in Catharanthus roseus Zellen konnte nach Einschluß der Zellen kontinuierlich in einem Reaktorsystem durchgeführt werden. Dabei entließen die Zellen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen ihre Produkte in das Medium. Trotz der offensichtlich eingetretenen Permeabilitätsänderung der Zellmembranen waren die Zellen weiterhin zur Regenerierung endogener Cofaktoren fähig.

Die Immobilisierung der Zellen konnte problemlos unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden. Die dabei gebildeten Alginatkugeln erwiesen sich während der Kultivierung in Schüttelkolben als sehr stabil gegenüber mechanischer Beanspruchung. Durch die im Alginatpolymerisat enthaltenen Poren war ein Stoffaustausch zwischen Zellen und Kulturmedium möglich, so daß die eingeschlossenen Zellen auch während langer Kulturdauer (33 Tage) nicht abstarben. Die einfache Handhabung, auch unter aseptischen Bedingungen, die leichte Formgebung der Polymerisate und die sehr gute Zellverträglichkeit des Alginates haben zur erfolgreichen Immobilisierung

pflanzlicher Zellen beigetragen. Die dabei beobachteten positiven Effekte auf den Zellmetabolismus lassen diese Methode als besonders geeignet erscheinen, um das biochemische Potential pflanzlicher Zellkulturen zur Gewinnung von Naturstoffen, auch im biotechnologischen Maßstab, einzusetzen.

8. Untersuchungen an isolierten Protoplasten und Vakuolen

Am Beispiel immobilisierter Zellen von Morinda citrifolia wurde deutlich, daß es durch eine geeignete Kulturtechnik gelingt, die Bildung der Inhaltsstoffe einer Zellkultur drastisch zu erhöhen. Ebenso war es durch die Zugabe der Vorstufe Tryptamin möglich, kultivierte Zellen von Catharanthus roseus zu einer um 300 % gesteigerten Indolalkaloidsynthese anzuregen (vgl. Kapitel III.4.2.). Die kultivierten Zellen waren also nicht in der Lage, bedeutend mehr ihrer Inhaltsstoffe zu produzieren, sondern auch größere Mengen ihrer Produkte in den Vakuolen zu speichern. Die Aufnahme- bzw. Speicherkapazität der Vakuolen stellt damit eine natürliche Grenze für die Höhe der Produktbildung einer pflanzlichen Zellkultur dar. Die Untersuchung stoffwechselphysiologischer Prozesse auf dem Niveau der Zelle selbst, sei es für die Synthese der Inhaltsstoffe, für Transport, Kompartimentierung oder Speicherung von Sekundärstoffen, kann wichtige Hinweise auf die Leistungsfähigkeit pflanzlicher Zellen und damit auf die einer Zellkultur geben. Für physiologische Studien haben sich Protoplasten pflanzlicher Zellen als geeignet erwiesen (MISHRA und ARORA, 1978; SCHNABL et al., 1978; LÖRZ und POTRYKUS, 1978). Die zellwandlosen Protoplasten ermöglichen zum Beispiel die schonende Isolierung von Zellorganellen (ZUILY-FODIL et al., 1978) und damit die Lokalisierung von Me-

taboliten oder Enzymen.

Durch Isolierung von Protoplasten aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von Zea mays konnten eindeutige Hinweise auf die Verteilung der Enzyme des CO_2 -Metabolismus in C_4 -Pflanzen erhalten werden (KANAI und EDWARDS, 1973). So konnten z.B. die Enzyme des reduktiven Pentose-Phosphat-Weges nur in Protoplasten der Bündelscheidenzellen nachgewiesen werden, während die Enzyme des C_4 -Metabolismus überwiegend in Mesophyll-Protoplasten aktiv waren. Dies zeigt, daß es möglich ist, nach Protoplastenisolierung Enzyme innerhalb der Zelle zu lokalisieren.

Nach Entfernen der Zellwände hat das Plasmalemma der Protoplasten Kontakt zu dem umgebenden Kulturmedium und darin enthaltenen Substanzen. Protoplasten eignen sich daher besonders gut zur Untersuchung der Transportvorgänge am Plasmalemma, die für die Aufnahme applizierter Substanzen in die Protoplasten verantwortlich sind.

Schon durch osmotischen Schock lassen sich die Vakuolen aus den Protoplasten freisetzen und stehen nach erfolgten Reinigungsschritten für Kompartimentierungs- und Transportuntersuchungen zur Verfügung. Auf diese Weise konnte an Bryophyllum daigremontianum nachgewiesen werden, daß der überwiegende Teil des im Laufe des CAM-Metabolismus anfallenden Malates in den Vakuolen der Zellen gespeichert wird (BUSER und MATILE, 1977). An isolierten Vakuolen von Beta vulgaris wurde die Aufnahme von Saccharose untersucht (DOLL et al., 1979) und man stellte fest, daß es sich dabei um eine energieabhängige Aufnahme gegen einen Konzentrationsgradienten handelt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an isolierten Protoplasten und Vakuolen wurden Zellen eines ausgewählten Stammes von Catharanthus roseus verwendet. Dabei sollten Enzyme der Indolalkaloidbiosynthese und deren Produkte innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Ferner sollte die Aufnahme von Sekundärstoffen in isolierte Vakuolen untersucht werden. Dafür sollten Vakuolen verschiedener Pflanzenarten isoliert und die Akkumulation von spezifischen und für die betreffende Pflanzenart unspezifischen Alkaloide verglichen werden. Aus diesen Untersuchungen sollten sich Hinweise auf die Fähigkeiten und Mechanismen der Zellen zur Akkumulation ihrer Inhaltsstoffe ergeben.

8.1. Lokalisierung von Enzymen und Endprodukten der Indolalkaloidbiosynthese

Um Enzyme und Endprodukte des Zellmetabolismus innerhalb der Zelle zu lokalisieren, besteht die Möglichkeit, Enzymaktivitäten und Produktgehalte isolierter Protoplasten und daraus freigesetzter Vakuolen mit denen ganzer Zellen in Beziehung zu setzen.

Zur Isolierung von Protoplasten aus Zellen von Catharanthus roseus wurden Zellen des Stammes RT 58 verwendet, die 6 Tage lang bei 30° C in Wachstumsmedium kultiviert worden waren. Die Zellen wurden vom Medium getrennt und wie im Methodenteil beschrieben in Enzymlösung A inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation hatten sich die Protoplasten der Zellen stark abgerundet, waren aber noch durch anhaftende Zellwandreste verbunden. Erst nach 4 - 6stündiger Inkubation war das Abdauen der Zellwandreste beendet und Protoplasten freigesetzt. Die isolierten Protoplasten wurden durch mehrmaliges Waschen mit Seewasser gereinigt und konzentriert.

Die Isolierung und Reinigung von Protoplasten aus Catharanthus roseus ist mehrfach beschrieben worden (KOBELITZ, 1975; DEUS, 1977; TANAKA und UCHIDA, 1979), und war auch bei dem hier verwendeten Stamm RT 58 problemlos möglich. Auch bei allen anderen im Laufe weiterer Untersuchungen verwendeten Pflanzenarten war die Isolierung von Protoplasten vollkommen unproblematisch. Da pro Ansatz bis zu 20 cm³ Zellmaterial aufgearbeitet werden konnte und die Protoplastenausbeute dabei sehr hoch (80 %) war, konnten so auch größere Mengen an Ausgangsmaterial für enzymatische Untersuchungen und Isolierung von Vakuolen gewonnen werden. Abbildung 22 zeigt isolierte Protoplasten von Catharanthus roseus nach erfolgter Reinigung und Anreicherung in 80 %igem Seewasser.

Aus den isolierten Protoplasten wurden durch Änderung der Osmolalität des Mediums die Vakuolen freigesetzt. Die Vakuolenisolierung und Reinigung wurde nach der von GROB und MATILE (1979) entwickelten Methode durchgeführt (vgl. Kapitel II.13.1.). Diese Technik war unter anderen zuvor getesteten Methoden (BOLLER und KENDE, 1979; SAUNDERS, 1979; SASSE et al., 1979) ausgewählt worden, da sie sehr saubere Vakuolenpräparationen ohne Kontamination durch Protoplasten oder Cytoplasmareste gewährleistete. Außerdem bot sie einige praktische Vorteile. Das Herstellen der Urografingradienten erwies sich als problemlos. Die Reinigung der Vakuolen erfolgte in zwei kurzzeitigen Zentrifugationsschritten in der Tischzentrifuge. Bereits 50 Minuten nach der Isolierung von Protoplasten standen so gereinigte Vakuolen (Abbildung 23) für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Bei allen anderen Aufarbeitungsmethoden waren langwierige Ultrazentrifugationsschritte erforderlich, bei denen bereits ein großer Teil der Vakuolen zerstört wurde.

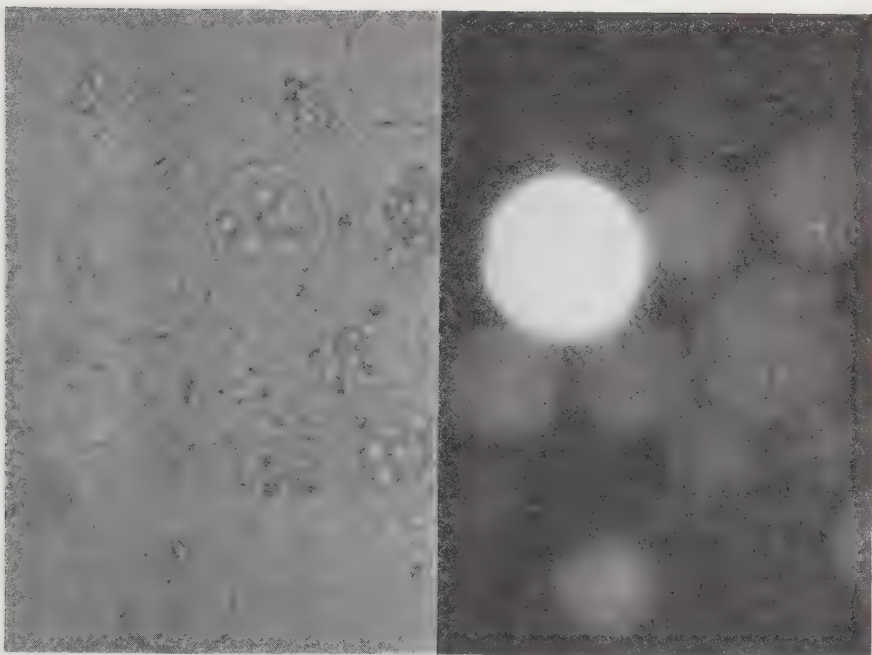


Abb. 22: Isolierte Protoplasten von Catharanthus roseus nach Reinigung und Anreicherung in 80 %igem Seewasser im Hellfeld betrachtet (links) und bei Auflichtfluoreszenz im UV-Bereich (rechts). Die sehr intensive Fluoreszenz eines der Protoplasten zeigt einen hohen Serpentinegehalt an (vgl. Kapitel 2 der Ergebnisse).

Vergrößerung: 400fach.

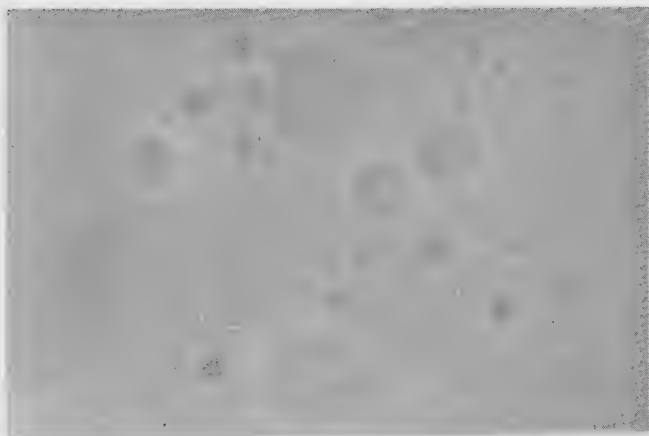


Abb. 23: Isolierte Vakuolen von *Catharanthus roseus* in 0.7 M NaCl-Lösung nach Reinigung durch Urografin-Dichtegradientenzentrifugation.

Vergrößerung: 200fach

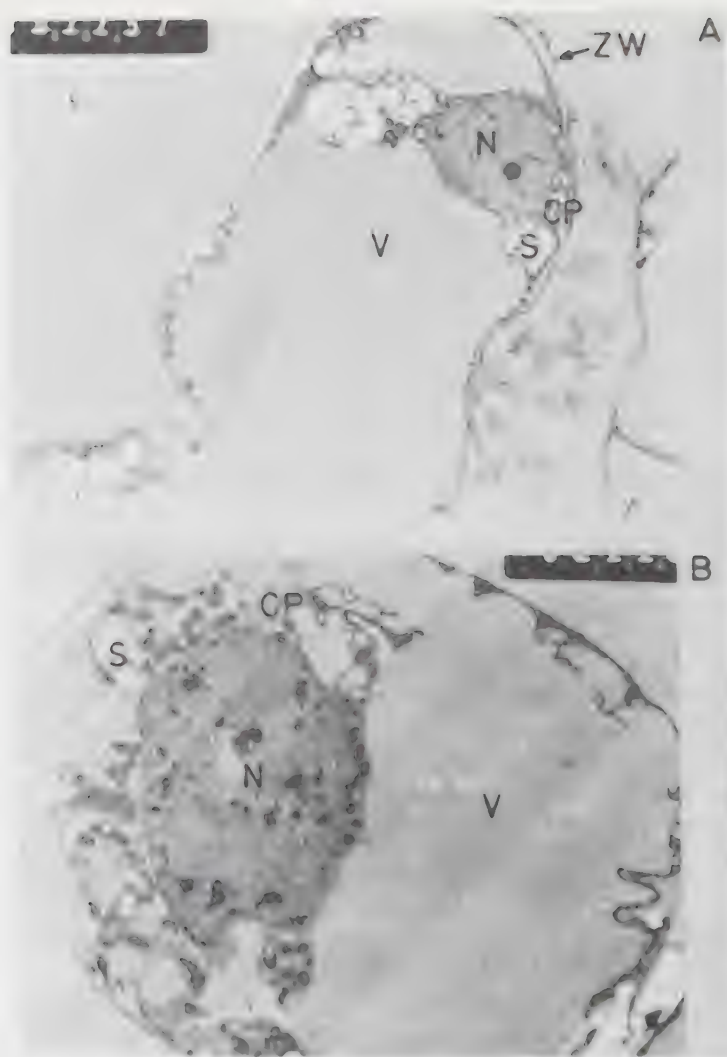
Nach erfolgter Reinigung wurde der Vakuolen- ebenso wie der Protoplastentiter der erhaltenen Suspensionen in einem Haemocytometer unter dem Mikroskop ausgezählt, da die zu bestimmenden Enzymaktivitäten und Produktgehalte u. a. auf eine Standardanzahl der untersuchten Protoplasten und Vakuolen bezogen werden sollten. Zur Bestimmung des Serpentinegehaltes wurden 0.5 ml Suspension mit bekannter Anzahl an Protoplasten und Vakuolen mit 0.5 ml 80 %igem Äthanol versetzt und 2 Stunden bei 30° C extrahiert. Der Serpentinegehalt der Extrakte wurde radioimmunologisch bzw. nach erfolgter Dünnschichtchromatographie fluorimetrisch bestimmt.

Abbildung 24 zeigt den Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von einer ganzen Zelle, einen daraus isolierten Protoplasten und einer freigesetzten Vakuole von Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen. Zelle (A) und Protoplast (B) besitzen eine große Vakuole, die etwa 3/4 ihrer Volumina einnimmt. Deutlich ist die Zellwand der kompletten Zelle (A) zu erkennen, die beim Protoplasten (B) enzymatisch entfernt worden war. In Abbildung C ist eine isolierte Vakuole dargestellt. Der Innenraum der Vakuole erscheint vollkommen strukturlos, die dem Tonoplasten außen anhaftenden fibrillären Strukturen sind eventuell Plasmafetzen, die sich beim Freisetzen der Vakuole nicht vom Tonoplasten gelöst hatten.

Frühere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an isolierten Protoplasten von Catharanthus roseus deuteten bereits daraufhin, daß Produkte der Indolalkaloidbiosynthese in der Vakuole der Zellen akkumuliert werden (DEUS, 1977). Die durch Anregung mit UV-Licht hervorgerufene intensive hellblaue Fluoreszenz des Serpentin war auf die Vakuole des Protoplasten beschränkt. Der die Vakuole umgebende Plasmasaum fluoreszierte dagegen nicht. Sehr viel deutlicher wird dieser Befund, wenn die Lyse von Protoplasten und dabei das Freisetzen der Vakuolen aus dem umgebenden Cytoplasma fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden.

Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer intakten Zelle (A), eines daraus isolierten Protoplasten (B) und einer freigesetzten Vakuole (C) aus Zellsuspensionskulturen von Catharanthus roseus.

Vergrößerung: (A) 3700fach; (B) 4600fach; (C) 15400fach;
(CP)Cytoplasma; (N)Zellkern; (S)Stärke; (T)Tonoplast;
(V)Vakuole; (ZW)Zellwand.



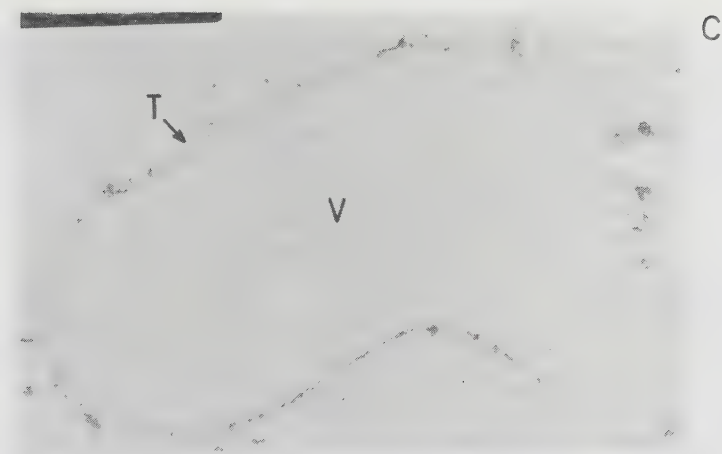


Abbildung 25 zeigt einen Protoplasten von Catharanthus roseus, der zur Isolierung der Vakuolen in Lysiermedium inkubiert worden war. Das Plasmalemma ist bereits aufgebrochen und die Vakuolen des Protoplasten trennen sich vom Cytoplasma. Die Auflichtfluoreszenz macht deutlich, daß nur die freigesetzten Vakuolen, nicht aber das Plasma das stark fluoreszierende Alkaloid Serpentin angereichert hatten.

Um diese Hinweise auf die Lokalisation des Indolalkaloids Serpentin in den Vakuolen von Catharanthus roseus bestätigen zu können, waren quantitative Untersuchungen notwendig. Zellen, daraus isolierte Protoplasten und Vakuolen von Catharanthus roseus wurden wie zuvor beschrieben extrahiert. Der Serpentinegehalt der Extrakte wurde mit dem Radioimmunoassay ermittelt und die gemessenen Gehalte auf eine konstante

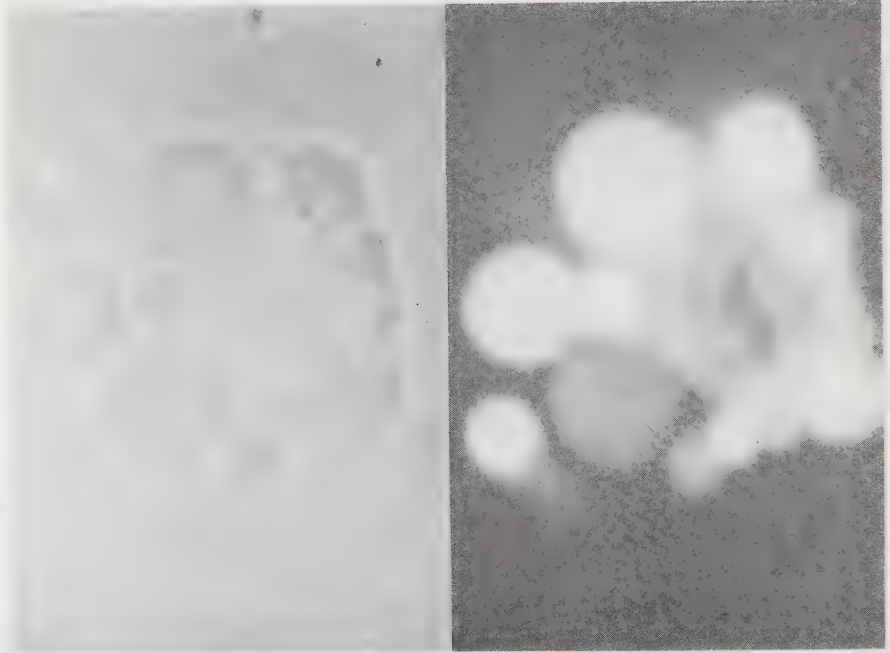


Abb. 25: Vakuolenfreisetzung aus einem Protoplasten von Catharanthus roseus.

links: Phasenkontrastmikroskopie

rechts: Auflichtfluoreszenz mit Fluoreszenzanregung im UV-Bereich.

Vergrößerung: 625fach.

Anzahl von Zellen, Protoplasten oder Vakuolen bezogen.
Die Ergebnisse der Untersuchungen können aus Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Der Vergleich des Serpentinegehaltes in Zellen, Protoplasten und isolierten Vakuolen von Catharanthus roseus.

Serpentinegehalt (nMol) pro 10 ⁶ Zellen/Protoplasten/Vakuolen	
Zelle	0.50
Protoplast	0.54
Vakuole	0.49

Bei der Isolierung der Vakuolen war das in den Zellen zuvor gemessene Serpentin nahezu vollständig in den Vakuolen erhalten geblieben. Die Serpentinmenge, die aus 10⁶ Vakuolen extrahiert worden war, war etwas geringer als der Serpentinegehalt der gleichen Anzahl von Protoplasten. Dieses Ergebnis beruht offensichtlich auf der Tatsache, daß aus einem Protoplasten mehrere Vakuolen freigesetzt werden können (vgl. Abbildung 25). Es kann also nicht generell erwartet werden, daß der Serpentinegehalt einer Vakuole dem Serpentinegehalt eines Protoplasten entspricht.

Durch die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse konnte eindeutig bestätigt werden, daß das Produkt der Indolalkaloidsynthese Serpentin in den Vakuolen kultivierter Zellen von Catharanthus roseus akkumuliert wird.

An isolierten Protoplasten und daraus freigesetzten Vakuolen wurde in anschließenden Versuchen auch die Lokalisation von Enzymen der Indolalkaloidbiosynthese in Zellen von Catharanthus roseus untersucht. Dafür wurde das Schlüsselenzym des Biosyntheseweges, die Strictosidin-Synthase (TREIMER und ZENK, 1979 b) ausgewählt. Die Strictosidin-Synthase katalysiert die Synthese von 3- α -(S)-Strictosidin aus den Vorstufen Tryptamin und Secologanin und leitet damit die Bildung der Indolalkaloide ein. Im darauffolgenden Reaktionsschritt wird der Glucoseteil des Strictosidins abgespalten und ein instabiles Aglykon gebildet, das in einen sehr reaktiven Dialdehyd übergeht (STÖCKIGT, 1979). Das Entfernen der Glucose aus dem Strictosidinmolekül wird von spezifischen β -D-Glucosidasen katalysiert (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980), deren Lokalisation innerhalb der Zelle ebenfalls ermittelt werden sollte. Im zellfreien System aus Zellkulturen von Catharanthus roseus kann die Aktivität einer unspezifischen Glucosidase gemessen werden, die o-Nitrophenyl- β -D-Glucosid als Substrat verwendet, aber auch die Bildung einiger Indolalkaloide katalysieren kann. Strictosidin-Synthase, spezifische und unspezifische Glucosidasen lassen sich säulenchromatographisch oder durch Gelfiltration voneinander trennen (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980). Die Biosynthese der Heteroyohimbinalkaloide in Catharanthus roseus wird daher nicht, wie früher angenommen (SCOTT et al., 1977), durch einen "Ajmalicin-Synthetase"-Enzymkomplex sondern durch trennbare nicht-aggregierte und sehr spezifische Enzyme katalysiert (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980).

Ob diese Enzyme eventuell auf dem Niveau der Zelle durch Kompartimentierung räumlich voneinander getrennt sind, kann z.B. durch Vergleich ihrer Enzymaktivitäten in Protoplasten und Vakuolen untersucht werden. Zum Identifizieren der Vakuolenfraktion wurde die Aktivität der sauren Phospha-

tasen bestimmt. Das Vorkommen der sauren Phosphatase-Aktivität weit überwiegend in den Vakuolen konnte an mehreren Geweben nachgewiesen werden (BUSER und MATILE, 1977; BUTCHER et al., 1977; METTLER und LEONARD, 1979).

Zellen, Protoplasten und isolierte Vakuolen wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgeschlossen und die Enzymaktivitäten der Strictosidin-Synthase, der spezifischen Glucosidase, der unspezifischen Glucosidase und der sauren Phosphatase in den Rohextrakten bestimmt. Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde gemessen und von einer bekannten Anzahl der Zellen, Protoplasten und Vakuolen der Gehalt an Serpentin analysiert. Die gemessenen Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt, auf den Serpentin-gehalt und auf eine konstante Anzahl von Zellen, Protoplasten und Vakuolen bezogen und sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt.

Zellen, Protoplasten und Vakuolen wiesen hohe Enzymaktivitäten der sauren Phosphatase auf. Dabei waren die Aktivitäten bezogen auf den Protein- und Serpentinegehalt und auf die Anzahl der getesteten Objekte für Protoplasten und Vakuolen etwa gleich hoch. Die Enzymaktivität im Rohextrakt aus kompletten Zellen war dagegen etwa doppelt so hoch. Dieser Befund kann auf die in den Zellwänden lokalisierte saure Phosphatase (ESAU und CHARVAT, 1975) zurückgeführt werden, die beim Zellaufschluß von den Zellwänden gelöst und daher im Rohextrakt ganzer Zellen mit erfaßt wurde. Die hohe Enzymaktivität in den Vakuolen, die mit der der Protoplasten übereinstimmte, deutete darauf hin, daß die saure Phosphatase in Catharanthus roseus Protoplasten fast ausschließlich in der Vakuole lokalisiert ist. Diese Beobachtung war auch bereits an Protoplasten aus Suspensionskulturen von Nicotiana glutinosa gemacht worden (METTLER und LEONARD, 1979). Die saure Phos-

Tabelle 15: Die Enzymaktivitäten der Strictosidin-Synthase, der spezifischen Glucosidase, der unspezifischen Glucosidase und der sauren Phosphatase in Zellen, Protoplasten und isolierten Vakuolen von Catharanthus roseus.

ENZYMAKTIVITÄT

Enzym	pkat/ µg Protein	pkat/ nMol Serpentin	pkat pro 10 ⁶ Zellen/Protoplasten/Vakuolen
<u>Strictosidin-Synthase</u>			
Zellen	0.18	44.1	20.5
Protoplasten	0.77	129.5	64.0
Vakuolen	0	0	0
<u>spezifische Glucosidase</u>			
Zellen	1.22	418	879
Protoplasten	1.63	275	550
Vakuolen	0.05	0.1	0.5
<u>unspezifische Glucosidase</u>			
Zellen	0.02	4.48	2.11
Protoplasten	0.01	1.90	1.00
Vakuolen	0	0	0
<u>saure Phosphatase</u>			
Zellen	9.5	2411	1100
Protoplasten	5.3	884	450
Vakuolen	5.2	946	542

phatase ist daher als "marker"-Enzym geeignet, um isolierte Vakuolen von Catharanthus roseus zu identifizieren.

In den Vakuolenextrakten war weder Aktivität der Strictosidin-Synthase noch der unspezifischen Glucosidase nachgewiesen worden. Die Enzymaktivität der spezifischen Glucosidase, die in dem Vakuolenextrakt gemessen wurde, war äußerst gering. Sie betrug nur 0,1 % der in den Protoplasten gemessenen Enzymaktivität und kann somit wohl auf eine geringfügige Kontamination der Vakuolensuspension zurückgeführt werden. Die Aktivitäten der Enzyme zur Indolalkaloidbildung und die Enzymaktivität der unspezifischen Glucosidase waren eindeutig nur in Zellen und den daraus isolierten Protoplasten aber nicht in den Vakuolen nachweisbar. Dieses Ergebnis spricht für eine cytoplasmatische Lokalisierung der Strictosidin-Synthase, sowie der unspezifischen und der spezifischen Glucosidase in Zellen von Catharanthus roseus. Untersuchungen an zellfreien Systemen haben ergeben, daß diese Enzyme nicht als "Ajmalicin-Synthetase"-Komplex in der Zelle vorliegen können (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980). Eine eventuelle räumliche Trennung ist dabei aber nicht durch Integration eines dieser Enzyme in die Vakuole gegeben, da sowohl die Enzyme der Indolalkaloidbildung als auch die unspezifische Glucosidase nicht in der Vakuole nachgewiesen werden konnten. Eine eventuell notwendige Trennung der unspezifischen von der spezifischen Glucosidase innerhalb der Zelle müßte daher durch Kompartimentierung im cytoplasmatischen Raum gegeben sein.

In isolierten Protoplasten von Catharanthus roseus konnten wichtige Enzyme der Indolalkaloidbildung nachgewiesen werden. Durch Applikation von Vorstufen an isolierte Protoplasten sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese zellwandfreien Einzelzellen noch in der Lage sind, die Biosynthese der Indolalkaloide vollständig bis zur Produktbildung durchzuführen.

8.2. Alkaloidbildung isolierter Protoplasten nach Applikation von Vorstufen

Aus einer Zellsuspension von Catharanthus roseus wurden nach 6tägiger Kultivierung Protoplasten isoliert. Die gereinigten Protoplasten wurden in dem zur Protoplastenkultivierung geeignetem Medium nach DURAND et al. (1973) aufgenommen. Der Protoplastentiter wurde dabei auf ca. 2×10^6 Protoplasten pro ml Medium eingestellt. Je 2 ml dieser Suspension wurden mit 0.5 μCi 2- ^{14}C -Tryptamin bzw. 2.5 μCi ^3H /0.5 μCi ^{14}C -Strictosidin versetzt und 14 Stunden unter leichtem Schütteln bei 30° C inkubiert. Danach wurden die Protoplasten beider Ansätze vom Medium getrennt und in je 5 ml 80 %igem Äthanol extrahiert. Die Radioaktivität in dem abgetrennten Medium und in den alkoholischen Extrakten wurde im Szintillationszähler bestimmt. Bei Applikation von ^{14}C -Tryptamin konnten noch 68 % der eingesetzten Aktivität im Medium festgestellt werden, 22 % der Aktivität wurde im alkoholischen Protoplastenextrakt gefunden. Von dem zugesetzten ^3H / ^{14}C -Strictosidin konnten 34 % aus den Protoplasten extrahiert werden, während 66 % der eingesetzten Aktivität im Medium zurückgeblieben waren. Die alkoholischen Extrakte wurden eingeeengt und Proben davon im Laufmittel IV chromatographiert. Die Radioaktivität der aufgetrennten Substanzen wurde mit einem Dünnschichtscanner erfaßt. An Hand von Vergleichssubstanzen konnte auf den Chromatogrammen sowohl bei Applikation von ^{14}C -Tryptamin als auch bei Fütterung von ^3H / ^{14}C -Strictosidin radioaktiv markiertes Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin identifiziert werden. Nach Zugabe von Strictosidin wurden die drei Isomere Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin im Verhältnis 2:1.5:1 gebildet. Isolierte Protoplasten von Catharanthus roseus sind also fähig, die ihnen angebotenen Vorstufen Tryptamin und Strictosidin aufzunehmen und zur Bildung ihrer Inhaltsstoffe

zu verwenden. Durch das Entfernen der Zellwände wurde die Synthesesequenz nicht behindert. Interessant ist dabei die Bildung von 19epi-Ajmalicin. 19epi-Ajmalicin konnte bisher noch nicht aus differenzierten Pflanzen isoliert werden, während die anderen beiden Isomere in Catharanthus-Pflanzen nachgewiesen werden konnten (SVOBODA, 1975). Auch in zellfreien Systemen aus Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurde nach Inkubation mit Tryptamin und Secologanin unter Zugabe von NADPH als Cofaktor Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin gebildet, hier allerdings im Verhältnis 1:2:0.5 (STÖCKIGT et al., 1976).

Isolierte Protoplasten von Catharanthus roseus konnten die ihnen applizierten Vorstufen aufnehmen und in ihre charakteristischen Inhaltsstoffe umwandeln, die sie daraufhin in der Vakuole deponieren. Da sich aus den Protoplasten sehr gut Vakuolen isolieren ließen, bietet sich hier die Möglichkeit, die Alkaloidaufnahme in dieses Zellkompartiment zu studieren, um dabei Hinweise auf die Transportvorgänge am Tonoplasten und auf die Aufnahmefähigkeit der Vakuolen zu erhalten.

8.3. Aufnahme applizierter Alkaloide durch isolierte Protoplasten und Vakuolen

Die Aufnahme applizierter Alkaloide wurde zuerst an Protoplasten von Catharanthus roseus untersucht. Die Protoplasten wurden für diese Untersuchung aus Gewebe des Stammes RT 58 isoliert. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden die Protoplasten in dem Inkubationsmedium nach DOLL et al. (1979) aufgenommen und der Protoplastentiter bestimmt. Proben von je 1 ml dieser Protoplastensuspension wurden mit radioaktiv markierten Alkaloiden wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Inkubation

wurde durch Filtrationszentrifugation beendet (vgl. Kapitel II.13.3.) und die von den Protoplasten aufgenommene Substanzmenge nach Abzug der Kontrollwerte ermittelt. Auf diese Weise wurde tritium-markiertes Vindolin an isolierte Protoplasten von Catharanthus roseus appliziert. Vindolin konnte als Inhaltsstoff der differenzierten Pflanze identifiziert werden (SVOBODA und BLAKE, 1975) und wurde als Hauptalkaloid in crown gall-Kulturen (BODER et al., 1964) aber nicht in Suspensionskulturen von Catharanthus roseus nachgewiesen. Zusammen mit Catharanthin ist es Baustein der Dimeren Indolalkaloide Vinblastin und Vincristin.

Tritium-markiertes Vindolin ($0.5 \mu\text{Ci} = 16 \text{ ng pro } 1 \text{ ml}$ Protoplastensuspension) wurden mit isolierten Protoplasten von Catharanthus roseus inkubiert und die zeitabhängige Aufnahme des Alkaloids verfolgt. Dabei wurde der Einfluß von ATP, MgCl_2 und KCl auf die Akkumulationsfähigkeit der Protoplasten untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 26 dargestellt. Als Maßstab für das aufgenommene Vindolin wurde hier die Zerfallsrate des Isotops angegeben. Zur Standardisierung der Aufnahmeraten wurde die Menge der aufgenommenen Substanz in diesem und allen weiteren Versuchen jeweils auf 1 nMol des in Protoplasten bzw. Vakuolen enthaltenen Serpentin bezogen.

Unter allen getesteten Versuchsbedingungen waren die isolierten Protoplasten in der Lage gewesen, das ihnen angebotene Vindolin aufzunehmen. Die Menge der während 100minütiger Inkubation angereicherten Substanz wurde dabei deutlich von dem gewählten Inkubationsmedium beeinflusst. Protoplasten, die in Medium mit ATP inkubiert worden waren, hatten deutlich weniger Vindolin aufgenommen als solche, denen kein ATP zugegeben worden war.

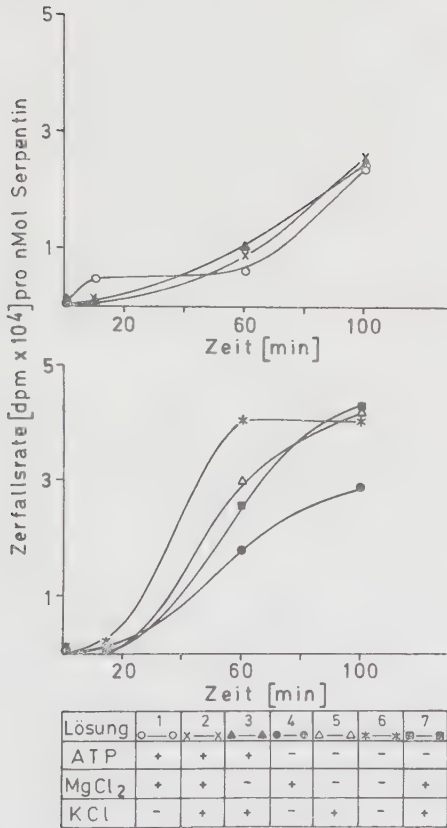


Abb. 26: Die zeitabhängige Vindolinaufnahme isolierter Protoplasten von *Catharanthus roseus* unter dem Einfluss verschiedener Inkubationslösungen. Es wurden 0.5 μ Ci (16 ng) ^3H -Vindolin pro 1 ml Protoplastensuspension ($2,2 \times 10^6$ Protoplasten) eingesetzt.

Außerdem war die Akkumulation von Vindolin unter Einfluß von ATP wesentlich langsamer abgelaufen. So hatten Protoplasten, die nur in Puffer und Osmotikum inkubiert worden waren, bereits nach 60 Minuten viermal mehr Vindolin aufgenommen als Protoplasten in ATP-haltigem Medium. Da die Vindolinaufnahme der Protoplasten nicht auf die Zugabe von ATP angewiesen war, könnte vermutet werden, daß das angebotene Alkaloid nicht durch einen aktiven Transportprozeß aufgenommen wird. Andererseits kann aber auch der endogene ATP-Gehalt der Protoplasten ausgereicht haben, um eine aktive Aufnahme des Alkaloids zu ermöglichen.

In ATP-haltigem Inkubationsmedium wurde die Vindolinaufnahme der Protoplasten durch zusätzlich enthaltenes $MgCl_2$ und/oder KCl nur unwesentlich beeinflusst. Nach 100 minütiger Inkubation in diesen drei verschiedenen Lösungen hatten die isolierten Protoplasten gleiche Mengen des angebotenen Vindolins aufgenommen. In nicht ATP-haltigen Inkubationslösungen wurde nur bei Zugabe von $MgCl_2$ allein deutlich weniger Vindolin aufgenommen. Protoplasten, die in den drei anderen nicht ATP-haltigen Lösungen inkubiert worden waren, hatten nach 100 Minuten gleiche Vindolinmengen akkumuliert.

Es ist anzunehmen, daß das Indolalkaloid Vindolin, ebenso wie Serpentin, in den Vakuolen der Zellen gespeichert wird. In anschließenden Versuchen wurde Vindolin daher an isolierte Vakuolen von Catharanthus roseus appliziert, um Hinweise auf die Transportmechanismen und die Anreicherung von Inhaltsstoffen innerhalb der Zelle zu erhalten. Isolierte Vakuolen wurden in dem Inkubationsmedium nach DOLL et al. (1979), das 1 mM $MgCl_2$ und 1 mM ATP enthielt, aufgenommen. Zu je 1 ml Vakuolensuspension wurden 0.5 μCi (16 ng) 3H -Vindolin zugegeben und wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Zu verschiedenen

Zeiten nach Zugabe des Vindolins wurde die Inkubation durch Filtrationszentrifugation beendet und die zeitabhängige Vindolinaufnahme durch Messen der Radioaktivität in den Vakuolen bestimmt (Abbildung 27). Als Maß für die Vindolinaufnahme wurde wiederum die Zerfallsrate bezogen auf den Serpentinegehalt der Vakuolen angegeben. Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurde die angebotene Substanz kontinuierlich von den Vakuolen aufgenommen. Wurde die Inkubationszeit darüber hinaus auf 120 Minuten verlängert, hatte die in dem Vakuolensediment gemessene Radioaktivität abgenommen. Offenbar war aufgrund der langen Versuchsdauer Lyse der Vakuolen eingetreten, so daß ein Teil des bereits aufgenommenen Vindolins wieder an das Inkubationsmedium verloren ging und bei der anschließenden Filtrationszentrifugation nicht mehr erfaßt wurde. Für alle weiteren Versuche zur Applikation von Alkaloiden an isolierte Vakuolen wurde die hier ermittelte optimale Inkubationszeit von 90 Minuten gewählt.

Für die bisher beschriebenen Untersuchungen war der pH-Wert des Inkubationsmediums wie in der Literatur beschrieben (DOLL et al., 1979) auf pH 7.6 eingestellt worden. Durch Variation des pH-Wertes sollte ermittelt werden, ob dieser pH-Wert für die Aufnahme von Vindolin optimal ist. Isolierte Vakuolen von Catharanthus roseus wurden daher in Inkubationslösung mit 1 mM $MgCl_2$ und 1 mM ATP (nach DOLL et al., 1979) mit unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von pH 5.0 - 8.0 aufgenommen und Proben (1 ml) dieser Suspensionen mit je 0.5 μCi (16 ng) 3H -Vindolin versetzt. Die Vindolinaufnahme in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums wurde nach 90minütiger Inkubation ermittelt (Abbildung 28). Dabei zeigte sich, daß der bisher eingestellte pH-Wert des Mediums für die Vindolinaufnahme der Vakuolen von Catharanthus roseus

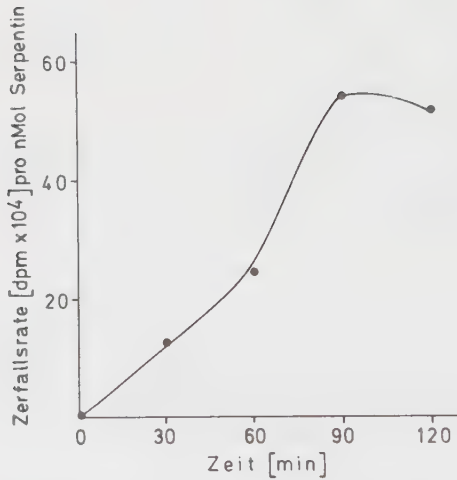


Abb. 27: Die zeitabhängige Vindolinaufnahme isolierter Vakuolen von *Catharanthus roseus* in Inkubationsmedium mit MgCl_2 (1 mM) und ATP (1 mM). Es wurden 0.5 μCi (16 ng) ^3H -Vindolin pro 1 ml. Vakuolensuspension eingesetzt.

noch nicht optimal gewesen war. Die höchste Vindolinaufnahme konnte in der Inkubationslösung mit dem pH-Wert von 6.5 gemessen werden. Alle folgenden Untersuchungen zur Alkaloidaufnahme durch isolierte Vakuolen wurden daher in Inkubationslösungen mit diesem für die Aufnahme optimalen pH-Wert durchgeführt.

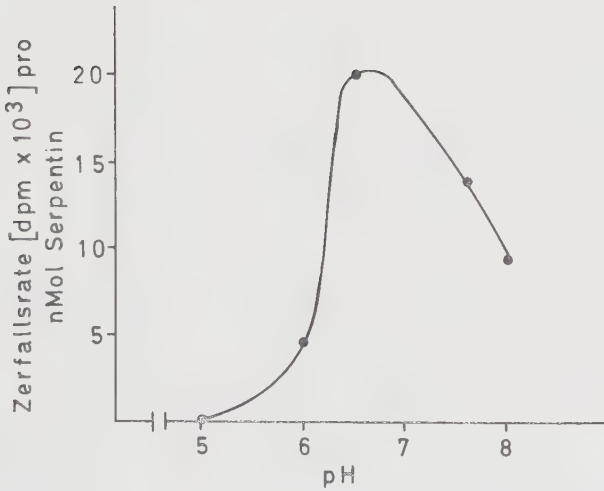


Abb. 28: Die Abhängigkeit der Vindolinaufnahme isolierter Vakuolen von *Catharanthus roseus* vom pH-Wert der Inkubationslösung bei 90minütiger Inkubation und Zusatz von $0.5 \mu\text{Ci}$ (16 ng) ^3H -Vindolin pro 1 ml Vakuolensuspension.

8.3.1. Untersuchung zur selektiven Aufnahme spezifischer Alkaloide

Zur Untersuchung, ob für die Aufnahme von Alkaloiden in die Vakuolen der Zellen ein selektives System vorhanden ist, oder ob es sich dabei um einen Diffusionsprozeß handelt, wurden isolierte Vakuolen verschiedener Pflanzenarten mit spezifischen und unspezifischen Alkaloiden inkubiert und die Aufnahme der angebotenen Substanzen untersucht. In Tabelle 16 sind die untersuchten Gewebe und die zur Protoplastenisolierung verwendeten Enzymlysungen (vgl. Kapitel II.12.1) zusammengefaßt.

Protoplasten aus Suspensionskulturen wurden, wie bereits beschrieben, isoliert und gereinigt. Zur Protoplastenisolierung aus Mesophyllzellen wurden junge Blätter der Pflanzen verwendet. Nach Entfernen der Mittelrippe wurden die Blattstücke mit einem scharfen Skalpell in 1 mm breite Streifen zerschnitten, die in der Enzymlysung inkubiert wurden. Die weitere Aufarbeitung der freigesetzten Protoplasten erfolgte wie bei Gewebe aus Suspensionskulturen. Aus den so gewonnenen Protoplasten wurden die Vakuolen mit der im Methodenteil beschriebenen Technik freigesetzt und gereinigt. Für die sich anschließenden Untersuchungen zur Alkaloidaufnahme wurden die Vakuolen mit dem Medium nach DOLL et al. (1979) aufgenommen, dessen pH-Wert auf den für die Vindolinaufnahme isolierter Vakuolen von Catharanthus roseus optimalen Wert eingestellt worden war. Zu je 1 ml Vakuolensuspension wurden jeweils 400 pMol folgender Substanzen zugegeben: Vindolin, Nikotin, Scopolamin, Serpentin, Ajmalicin, Ajmalin und Catharanthin. Dabei war eine bekannte Menge dieser Alkaloide tritium-markiert zugesetzt worden. Nach 90minütiger Inkubationszeit wurden die Versuche durch Filtrationszentrifugation beendet. Aus der in den abzentrifu-

Tabelle 16: Pflanzenmaterial, das zur Protoplastenisolierung für die sich anschließende Gewinnung von Vakuolen verwendet wurde und die zur Protoplastengewinnung notwendigen Enzymlösungen.

Pflanzenart	Herkunft der Zelle	Enzymlösung (vgl. Kap. II.12.1.)
Catharanthus roseus	Suspensions- kultur	A
Catharanthus roseus	Mesophyll	D
Rauwolfia serpentina	Suspensions- kultur	A
Nicotiana glauca	Suspensions- kultur	B
Duboisia myoporoides	Suspensions- kultur	B
Datura sanguinea	Mesophyll	A
Datura meteloides	Suspensions- kultur	A
Daucus carota	Suspensions- kultur	C

gierten Vakuolen gemessenen Radioaktivität wurde nach Abzug des Kontrollwertes die Menge der aufgenommenen Alkaloide ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Selektive Aufnahme applizierter Alkaloide durch isolierte Vakuolen verschiedener Pflanzenarten. Pro 1 ml Inkubationsansatz wurden je 400 μ Mol der Substanzen angeboten. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten.

* Vakuolen wurden aus Mesophyllzellen isoliert.

- Alkaloidaufnahme wurde nicht untersucht.

		aufgenommenes Alkaloid (μ Mol) pro 10^6 Vakuolen						
	Catharanthus roseus	Catharanthus roseus *	Rauwolfia serpentina	Nicotiana sylvestris	Duboisia myoporoides	Datura sanguinea *	Datura meteloides	Daucus carota
Vindolin	114.6	46.8	43.5	0	0	0	0	0
Nikotin	0.4	-	-	6.0	-	-	-	-
Scopolamin	0	1.2	0	0.8	3.1	2.9	6.6	0
Serentin	0	0	0	0	-	0	0	0
Ajalicin	80.8	74.7	31.4	0	0	0	0	0
Ajmalin	4.6	-	5.0	0	-	-	-	0
Catharanthin	31.0	230.2	211.0	-	0	0	-	-

Bei allen getesteten Pflanzenarten wurden selektiv nur diejenigen angebotenen Alkaloide in die isolierten Vakuolen aufgenommen, die als ein spezifischer Inhaltsstoff des betreffenden pflanzlichen Gewebes bekannt sind. So nahmen Vakuolen von Rauwolfia serpentina und Catharanthus roseus nur die für die differenzierte Pflanze typischen Indolalkaloide Vindolin, Ajmalicin, Ajmalin und Catharanthin (vgl. STEINEGGER und HÄNSEL, 1972) in nennenswertem Umfang auf. Die in Catharanthus roseus Vakuolen gemessenen Nikotin- und Scopolaminaufnahmen waren dagegen äußerst gering und sind wohl auf Anhaftungen an den Vakuolen zurückzuführen.

An Vakuolen aus Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurde eine geringe Aufnahme von Ajmalin gemessen. Ajmalin konnte bisher nicht als Inhaltsstoff von Catharanthus roseus nachgewiesen werden (SVOBODA und BLAKE, 1975), ist aber eines der Hauptalkaloide der verwandten Apocynaceae Rauwolfia serpentina (STEINEGGER und HÄNSEL, 1972). Trotzdem wurde auch von Vakuolen aus Rauwolfia serpentina Zellen im Vergleich zu den anderen Indolalkaloiden nur relativ wenig Ajmalin aufgenommen. Möglicherweise wird nicht das Endprodukt Ajmalin selbst, sondern bevorzugt dessen Vorstufe in die Vakuolen transportiert und dort zu Ajmalin metabolisiert. Erstaunlicherweise wurde das für beide Apocynaceen spezifische Serpentin, dessen abschließliche Lokalisation in der Vakuole von Catharanthus roseus Zellen nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel III.8.1. dieser Arbeit), weder von Vakuolen aus Catharanthus roseus Suspensionskulturen oder Mesophyllzellen noch von Vakuolen aus Rauwolfia serpentina aufgenommen. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls vermuten, daß Serpentin in den Zellen selbst erst beim Durchtritt durch den Tonoplasten oder erst in der Vakuole aus seiner Vorstufe Ajmalicin durch Dehydrierung gebildet wird.

Vakuolen von Nicotiana sylvestris hatten von den angebotenen Substanzen nur Nikotin und geringfügige Menge von Scopolamin aufgenommen. Scopolamin wiederum gehört zu den Tropan-Alkaloiden, die typische Inhaltsstoffe der Solanaceae, so auch von Datura- und Duboisia-Arten (STEINEGGER und HÄNSEL, 1972) sind. Dieses Tropan-Alkaloid wurde nur von Vakuolen aus Duboisia myoporoides, Datura meteloides und Datura sanguinea aufgenommen. Obwohl die Menge der aufgenommenen Substanzen deutlich geringer war, verglichen mit der Aufnahme der Indolalkaloide durch Vakuolen der beiden Apocynaceae-Arten, konnte auch bei den Solanaceae-Vakuolen die Selektivität für die spezifischen Inhaltsstoffe festgestellt werden.

Zur Kontrolle wurden Vakuolen von Daucus carota isoliert und mit einigen der zuvor getesteten Alkaloiden inkubiert. Daucus carota gehört zu den Apiaceae und enthält weder Indol- noch Tropan-Alkaloide. Nach 90minütiger Inkubation isolierter Vakuolen mit Vindolin, Scopolamin, Serpentin, Ajmalicin und Ajmalin konnte in keinem einzigen Fall eine Aufnahme einer dieser Substanzen in die Vakuolen von Daucus carota festgestellt werden. Dieser Befund schließt aus, daß es sich bei der Alkaloidaufnahme in die Vakuolen um einen unkontrollierten Prozeß zum Ausgleich eines Konzentrationsgradienten handelt. Die Aufnahme von ausschließlich Pflanzen-spezifischen Inhaltsstoffen deuten auf einen hoch selektiven, artspezifischen Transportmechanismus hin, der die Aufnahme von Sekundärstoffen in die Vakuolen der Zellen kontrolliert.

8.3.2. Parameter der Akkumulation applizierter Alkaloide durch isolierte Vakuolen

Weiterführende Untersuchungen befaßten sich mit der Abhängigkeit der Alkaloidaufnahme isolierter Vakuolen von der Menge der angebotenen Alkaloide. Dabei sollte überprüft werden, ob die Alkaloidakkumulation durch hohe Substratkonzentrationen zu sättigen ist, um eventuell Hinweise auf die Speicherungsfähigkeit der Vakuolen für ihre Inhaltsstoffe zu erhalten.

Aus Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurden Vakuolen isoliert und je 1 ml der Suspension mit steigenden Mengen von Ajmalicin, Vindolin und Catharanthin im Medium nach DOLL et al. (1979) bei optimalem pH-Wert 90 Minuten inkubiert. Nach der abschließenden Filtrationszentrifugation wurde die Aufnahme der Substanz in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzmenge ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 29 A dargestellt.

Die Aufnahme der Substanzen war deutlich von der Menge des angebotenen Alkaloids abhängig. Bei Applikation von Catharanthin wird der hyperbolische Kurvenverlauf der Substanzaufnahme bei steigenden Alkaloidkonzentrationen besonders deutlich. Aber auch bei Zugabe hoher Konzentrationen von Ajmalicin und Vindolin deutet sich eine Substratsättigung der Alkaloidaufnahme an. Die Mengen der im Sättigungsbereich aufgenommenen Substanz waren untereinander sehr verschieden. Maximal waren im Sättigungsbereich von 1100 pMol angebotenen Ajmalicin 110 pMol von 10^6 Vakuolen aufgenommen worden, das sind 10 % der eingesetzten Ajmalicinmenge. Bei gleicher Konzentration des angebotenen Alkaloides wurden von Vindolin nur 21 pMol und von Catharanthin 23 pMol aufgenommen. Isolierte Va-

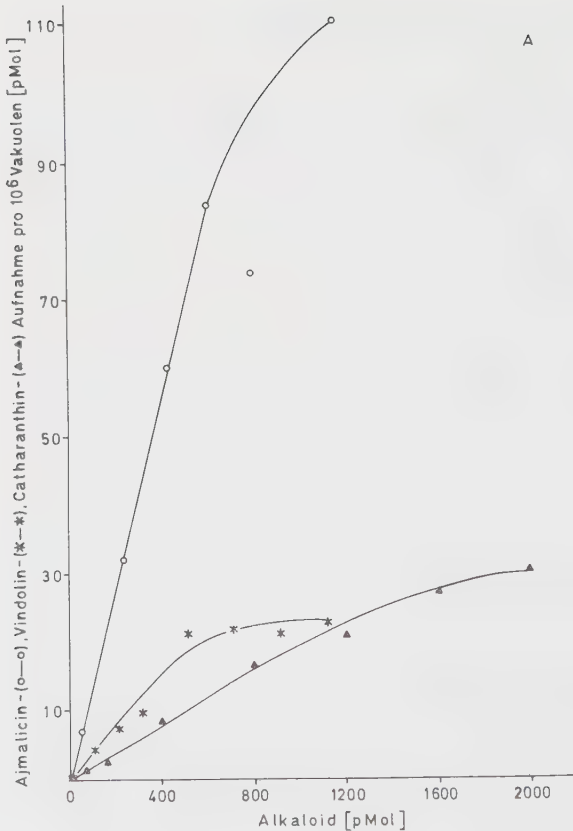
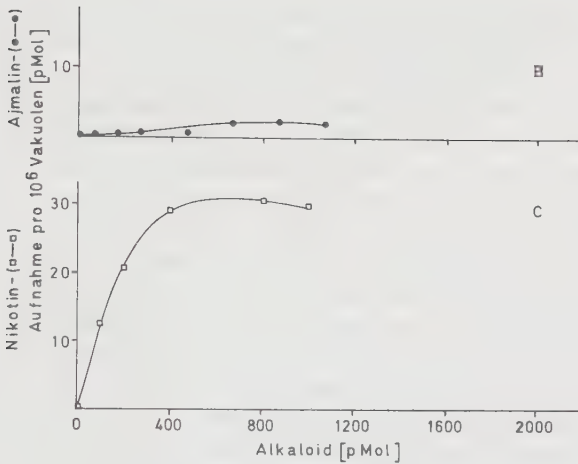


Abb. 29: (A) Die Alkaloidaufnahme isolierter Vakuolen von *Catharanthus roseus*,
(B) die Ajmalinaufnahme isolierter Vakuolen von *Rauwolfia serpentina* und
(C) die Nikotinaufnahme isolierter Vakuolen von *Nicotiana glauca*

während 90minütiger Inkubation in Medium mit $MgCl_2$ (1 mM) und ATP (1 mM) in Abhängigkeit von der Alkaloidkonzentration im Inkubationsmedium.



kuolen von Catharanthus roseus zeigten also eine deutliche Präferenz zur Aufnahme von Ajmalicin.

Untersuchungen zur Substratsättigung wurden auch an isolierten Vakuolen von Nicotiana glauca unter Applikation von Nikotin (Abbildung 29 C) und an Va-

kuolen von Rauwolfia serpentina nach Zugabe von Ajmalin durchgeführt (Abbildung 29 B). Auch bei diesen Systemen zeigte sich, daß die Aufnahme und Anreicherung der Alkaloide in den Vakuolen durch hohe Konzentrationen der angebotenen Substanzen gesättigt wurden. Die Menge des dabei gemessenen Ajmalins in Vakuolen von Rauwolfia serpentina war auch hier nur gering (vgl. Kapitel 8.3.1.).

Die Werte der aufgenommenen Substanzmengen pro 10^6 Vakuolen wurden gegen die Substratkonzentrationen in Form von Lineweaver-Burk-Diagrammen aufgetragen. Daraus konnten die K_M -Werte für die Alkaloidaufnahme der isolierten Vakuolen ermittelt werden. Sie betrugen für Vindolin $1 \mu\text{M}$, Catharanthin $2,5 \mu\text{M}$, Ajmalicin $1,67 \mu\text{M}$ bei Vakuolen von Catharanthus roseus. Die Nikotinaufnahme durch Vakuolen von Nicotiana sylvestris hatte einen K_M -Wert von $0.23 \mu\text{M}$ und bei der Ajmalinaufnahme durch Vakuolen von Rauwolfia serpentina betrug der K_M -Wert $1 \mu\text{M}$. Die K_M -Werte für die Alkaloidaufnahme isolierter Vakuolen liegen in einem Bereich, der für sehr affine Transportsysteme charakteristisch ist. So wurden z.B. an Escherichia coli spezifische hochaffine Transportsysteme für die Aminosäureaufnahme nachgewiesen. Die K_M -Werte betrugen hier für die Aufnahme von Lysin $0.5 \mu\text{M}$, für Ornithin $1.4 \mu\text{M}$ und für Arginin sogar nur $0.03 \mu\text{M}$ (ROSEN, 1971).

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene charakteristische Sättigung der Substanzaufnahme bei hohen Konzentrationen der angebotenen Alkaloide weist auf ein spezielles Aufnahmesystem im Tonoplasten hin, das für den Transport der Sekundärstoffe in die Vakuole zuständig ist. Diese Vermutung wird außerdem durch die hohe Spezifität der Alkaloidaufnahme unterstützt. Eine entsprechende Beobachtung in Bezug auf die Zuckeraufnahme konnte an Vakuolen aus Gewebe von Beta vulgaris gemacht werden (WILLENBRINK und DOLL, 1979). An diesen Vakuolen konnte ein aktives

Transportsystem für die Saccharoseaufnahme nachgewiesen werden. Für die Saccharoseaufnahme wurde ein K_M -Wert von 16 ± 2 mM (25° C) ermittelt. Das Aufnahmesystem im Tonoplasten war hier für den Transport von Saccharose spezialisiert. Andere angebotene Zucker (Glucose, Fructose, Maltose) wurden in sehr viel geringerem Ausmaß von den Vakuolen aufgenommen. Die Saccharose wurde gegen einen Konzentrationsgradienten akkumuliert und durch Zugabe von ATP wurde die Saccharoseanreicherung um 30 % gefördert (DOLL et al., 1979). Weiterführende Untersuchungen an Vakuolen von Beta vulgaris zeigten eine Tonoplast-gebundene ATPase Aktivität, die von Protonen im Inkubationsmedium beeinflusst wurde. Aus diesen Daten wurde für die Saccharoseakkumulation der Vakuolen ein energieabhängiger Aufnahmemechanismus angenommen, dessen Energiebedarf in Form von ATP durch die ATPase am Tonoplasten gedeckt wird (DOLL et al., 1979). An Kotyledonen von Ricinus communis konnte dagegen gezeigt werden, daß die Saccharoseaufnahme des Gewebes wohl ATP-abhängig ist, daß das ATP dabei aber nicht direkt mit dem Aufnahmesystem reagiert. Der aktive Transport von Saccharose durch den Tonoplasten ist hier mit einem Protonencotransport gekoppelt (KOMOR, 1977).

Um Hinweise auf den Mechanismus der Alkaloidaufnahme von isolierten Vakuolen aus Catharanthus roseus zu erhalten, wurde der Einfluß von ATP, $MgCl_2$ und KCl auf die Aufnahme von Vindolin untersucht. Als Grundlage für das Inkubationsmedium wurde die Lösung nach DOLL et al. (1979) verwendet und ATP (1 mM), $MgCl_2$ (1 mM) und KCl (50 mM) in verschiedenen Kombinationen zugegeben. Je 1 ml dieser Vakuolensuspensionen wurden mit 450 pMol Vindolin versetzt und 90 Minuten inkubiert. Nach der abschließenden Filtrationszentrifugation wurde die Vindolinaufnahme unter dem Einfluß der verschiedenen Inkubationslösungen ermittelt (Abbildung 30).

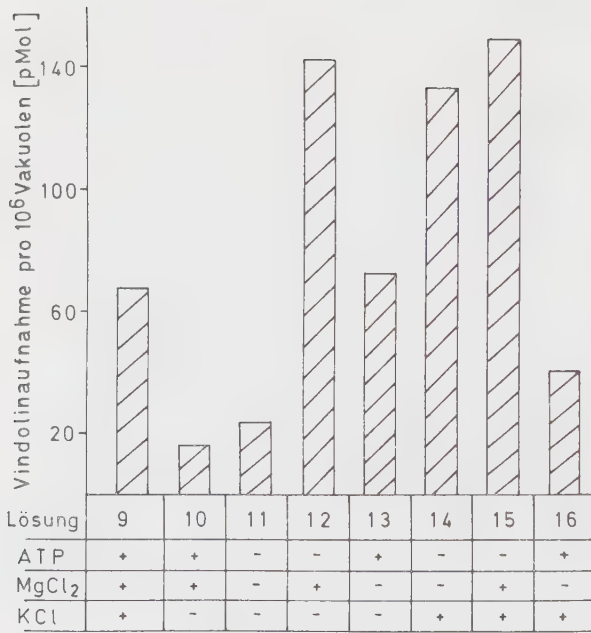


Abb. 30: Die Vindolinaufnahme isolierter Vakuolen von *Catharanthus roseus* während 90minütiger Inkubation in verschiedenen Medien. Es wurden 450 pMol Vindolin pro 1 ml Vakuolensuspension (ca. 3.2×10^5 Vakuolen) eingesetzt.

Vakuolen, die in Medium ohne ATP inkubiert worden waren, hatten wesentlich mehr Vindolin aufgenommen als Vakuolen in vergleichbaren Lösungen mit ATP. So konnte im Medium, dem nur KCl zugesetzt worden war, etwa 3mal mehr Vindolin von den Vakuolen aufgenommen werden als im Medium mit Zusatz von KCl und ATP. Die Zugabe von $MgCl_2$ und KCl allein oder in Kombination hatte einen positiven Einfluß auf die Vindolinaufnahme ausgeübt. KCl allein bewirkte z.B. eine 9fache Steigerung der Vindolinaufnahme im Vergleich zu Vakuolen, die nur in Puffer und Osmotikum (Lösung 11) inkubiert worden waren.

Die Tatsache, daß ATP-Zugabe die Vindolinaufnahme der Vakuolen nicht fördern konnte, sondern sogar hemmend wirkte, deutete darauf hin, daß der Transport von Alkaloiden durch den Tonoplasten hindurch nicht ATP-abhängig ist. Andererseits wurde nachgewiesen, daß Vakuolen selbst ATP enthalten (DOLL et al., 1979). Der endogene ATP-Gehalt der Vakuolen hätte also für den Eintransport der Alkaloide genügt haben können. Bei den von DOLL et al. (1979) untersuchten Vakuolen von Beta vulgaris wurde die Saccharoseaufnahme durch zusätzlich appliziertes ATP um 30 % gefördert. Im Gegensatz dazu wurde die Alkaloidaufnahme der hier untersuchten Vakuolen von Catharanthus roseus deutlich durch exogenes ATP um 70 % gehemmt. Die fördernde Wirkung von exogenem KCl auf die Vindolinakkumulation isolierter Vakuolen von Catharanthus roseus läßt außerdem vermuten, daß der Aufnahme applizierter Alkaloide in die Vakuolen nicht ein ATP-abhängiger, sondern eventuell ein elektrochemischer Prozeß zugrunde liegt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Aufnahme der Alkaloide um einen Konzentrationsausgleich zwischen dem Gehalt der Vakuole und dem des Inkubationsmediums handelt,

wurden die Innen- und Außenkonzentrationen der angebotenen Alkaloide bestimmt. Dafür wurden die für die Substrat-abhängige Vindolin- und Ajmalicinaufnahme von Catharanthus roseus Vakuolen ermittelten Werte verwendet. Zum Errechnen der Alkaloid-Innenkonzentrationen wurde ein durchschnittliches Vakuolenvolumen von 31 pl ermittelt. Tabelle 18 zeigt die Vindolin (A)- bzw. Ajmalicinkonzentrationen im Medium und in den isolierten Vakuolen nach 90minütiger Inkubation der Vakuolen im Medium nach DOLL et al. (1979) unter Zugabe steigender Mengen von Vindolin bzw. Ajmalicin. Dabei wurde der Vindolin- bzw. Ajmalicingehalt von 10^5 Vakuolen zugrunde gelegt.

Wie aus Tabelle 18 A zu entnehmen ist, scheint es sich bei der Vindolinaufnahme durch die Vakuolen bis zum Erreichen der Sättigungskonzentration um einen reinen Konzentrationsausgleich zwischen dem Vindolingehalt des Mediums und dem der Vakuolen gehandelt zu haben. Ist eine Konzentration von ca. $0.7 \mu\text{M}$ in den Vakuolen erreicht, konnte auch durch erhöhte Vindolinaußenkonzentration keine Zunahme von Vindolin in den Vakuolen erreicht werden. Auch bei der Ajmalicinaufnahme isolierter Vakuolen (Tabelle 18 B) deutet sich eine Sättigung der Alkaloidaufnahme durch hohe Ajmalicinaußenkonzentrationen an (vgl. Abbildung 29 A). Durch die Aufnahme von Ajmalicin wurde aber nicht nur der Ausgleich zwischen der Ajmalicinkonzentration des Mediums und der der Vakuolen erreicht. Ajmalicin wurde bis zum Sättigungswert gegen einen Konzentrationsgradienten in den Vakuolen von Catharanthus roseus akkumuliert. Die Sättigung der Alkaloidaufnahme zeigt, daß entweder die Grenze der Speicherkapazität der Vakuolen erreicht war oder aber, daß das Transportsystem für die Aufnahme der Alkaloide durch hohe Substratkonzentrationen abgesättigt worden war.

Tabelle 18: Bestimmung der Vindolin-(A) und Ajmalicinkonzentrationen (B) im Medium und in isolierten Vakuolen von *Catharanthus roseus*. Es wurden steigende Vindolin-(0 - 1100 pMol/1 ml) und Ajmalicimmengen (0 - 1150 pMol/1 ml) angeboten und die Alkaloidaufnahme in die Vakuolen (ca. 3.2×10^5 Vakuolen/ml) nach 90minütiger Inkubationsdauer bestimmt.

A V i n d o l i n (µmolar)	
Inkubationsmedium	Vakuolen
0	0
0.11	0.15
0.21	0.24
0.32	0.32
0.50	0.69
0.70	0.71
0.90	0.71
1.10	0.74

B A j m a l i c i n (µmolar)	
Inkubationsmedium	Vakuolen
0	0
0.06	0.24
0.24	1.04
0.42	1.93
0.60	2.71
0.78	2.40
1.15	3.58

Zusammenfassend läßt sich aus den oben beschriebenen Ergebnissen schließen, daß es sich bei der Aufnahme von Alkaloiden in isolierte Vakuolen vermutlich nicht um einen ATP-abhängigen, sondern eventuell um einen elektrochemischen Prozeß handelt. Bei der Vindolinaufnahme durch isolierte Vakuolen von Catharanthus roseus wird ein Konzentrationsausgleich zwischen dem Alkaloidgehalt des Mediums und dem der Vakuole erreicht, Ajmalicin wird dagegen sogar gegen einen Konzentrationsgradienten in den Vakuolen angereichert. Bei der Alkaloidaufnahme kann es sich also nicht um eine Diffusion handeln, da die Alkaloidaufnahme durch hohe Konzentrationen zu sättigen ist und sehr selektiv nur die für das betreffende pflanzliche Gewebe spezifischen Inhaltsstoffe aufgenommen werden. Die Aufnahme von Alkaloiden in die Vakuole der Zellen wird also offensichtlich durch ein spezielles System innerhalb des Tonoplasten reguliert und kontrolliert und so die Akkumulation von Inhaltsstoffen limitiert.

IV. DISKUSSION

Viele der von Mikroorganismen und höheren Pflanzen gebildeten Inhaltsstoffe sind für den Menschen lebensnotwendig und können trotz der Fortschritte der chemischen und pharmazeutischen Technologie noch nicht synthetisch hergestellt werden. Wichtige Rohstoffe wie Kautschuk, Gerbstoffe, Harze oder ätherische Öle werden aus Pflanzen gewonnen. Besonders unentbehrlich sind Pflanzen und Mikroorganismen aber als einzige Quelle für zahlreiche Arzneistoffe, so z.B. für herzwirksame Glykoside, Alkaloide oder Anthrachinone.

Seitdem es gelungen ist, isolierte Pflanzenzellen mit künstlichen Nährmedien als Kallus- oder Suspensionkultur zu kultivieren, wurde versucht, Zellkulturen zur Produktion von Naturstoffen einzusetzen. Kultivierte Zellen bieten gegenüber intakten Pflanzen wesentliche Vorteile, die sie besonders in Hinsicht auf die Gewinnung medizinisch-therapeutisch wichtiger Substanzen interessant machen. Durch intensive Forschung auf dem Gebiet der Zellkulturtechnik ist es heute prinzipiell möglich, jede beliebige Pflanzenart zur Anlage von Zellkulturen zu verwenden. Um kultivierte Zellen zur Gewinnung ihrer Inhaltsstoffe, auch im biotechnologischen Maßstab, nutzen zu können, sind Zellstämme mit besonders hohen Produktgehalten notwendig. Daher wurde auf vielfache Weise versucht, die Sekundärstoffproduktion kultivierter Zellen zu optimieren. Noch zu Beginn der 70er Jahre waren die bis dahin erzielten Erfolge nicht aussichtsreich erschienen, um eine industrielle Nutzung von Zellkulturen zur Gewinnung von Sekundärstoffen lohnend zu machen (TEUSCHER, 1973). Bereits fünf Jahre später konnte ZENK (1978 a) von wesentlichen Erfolgen auf dem Gebiet der Zellkulturforschung berichten und 12 Pflanzenarten angeben, deren Sekun-

därstoffgehalte in kultivierten Zellen gleich oder sogar deutlich höher waren als die der differenzierten Pflanze. Diese Erfolge waren zum Teil auf die Isolierung von Zellstämmen zurückzuführen, die innerhalb einer Zellpopulation durch besonders hohe Sekundärstoffgehalte aufgefallen waren. Das Auftreten solcher varianten Stämme zeigt, daß offensichtlich selbst die Zellen einer Population zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen bei der Produktion ihrer Inhaltsstoffe fähig sind.

An Kalluskulturen von Nicotiana rustica war die Variationsbreite der Nikotinproduktion an Zellstämmen untersucht worden, die sich aus einzelnen Zellen einer neu angelegten Kalluskultur entwickelt hatten (TABATA und HIRAOKA, 1976). Bei zehn willkürlich ausgesuchten Zellstämmen wurden große Unterschiede (0,004 % - 0,09 %) im Nikotingehalt festgestellt. Vier der untersuchten Stämme hatten weniger Alkaloid als der Ausgangsstamm gebildet, aber zwei der Zellklone von Nicotiana rustica wiesen einen 10fach höheren Nikotingehalt als die zum Plattieren der Zellen verwendete Ausgangskultur auf. Im Laufe weiterer Kultivierung waren die Nikotingehalte der wenig Alkaloid produzierenden Stämme konstant niedrig, während die Stämme mit hohem Nikotingehalt wiederum in Subkulturen mit hoher und mit sehr niedriger Nikotinproduktion aufspalteten. Als Ursache für diese Variationen nahmen TABATA und HIRAOKA (1976) "bestimmte genetische oder cytoplasmatische Veränderungen der kultivierten Zellen" an, die ihre Fähigkeit zur Alkaloidbildung beeinflußt hatten. Auch das Auftreten spontaner Mutationen während der Klonierung der isolierten Tabakzellen wurde von den Autoren als mögliche Ursache für das Auftreten varianter Zellen nicht ausgeschlossen.

Durch Genmutationen, Chromosomenaberrationen oder aber auch durch epigenetische Phänomene können variante Zellen entstehen, die veränderte enzymatische Regulation oder sogar ein von der Wildtypzelle abweichendes Enzymmuster aufweisen und zu geänderter Produktion von Inhaltsstoffen fähig sind. Dabei kann die Bildung der Endprodukte selbst oder aber auch die Bereitstellung der für die Synthese der Inhaltsstoffe notwendigen Vorstufen beeinflußt worden sein. Als mögliche Ursache für geringere oder fehlende Sekundärstoffproduktion hatte TEUSCHER (1973) vermutet, daß die für die Naturstoffbildung nötigen Enzyme nicht in genügendem Maße gebildet werden oder völlig fehlen, oder daß die Vorstufen für die Biogenese nicht in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen.

Daß das Fehlen spezifischer Enzyme für Variationen im Alkaloidgehalt kultivierter Zellen verantwortlich ist, konnte an Kalluskulturen von Stephania cepharantha gezeigt werden (AKASU et al., 1976). Das Kallusgewebe enthielt nicht die für die differenzierte Pflanze spezifischen Alkaloide Cepharanthin und Isotetrandrin, sondern deren Vorstufen Aromolin und Berbamin (Abbildung 31). Durch Mangel an spezifischen Enzymen für Methylierung und Methylendioxygruppenbildung konnten die Kalluszellen die Endprodukte des Biosyntheseweges nicht bilden. Dagegen waren die Gehalte der im Kallusgewebe gefundenen Vorstufen Aromolin und Berbamin wesentlich höher (4fach) als in der differenzierten Pflanze. Wenn auch die Ursache für das Fehlen der Enzyme in diesem Fall unbekannt ist, wird deutlich, wie sich das veränderte Enzymmuster kultivierter Zellen auf ihre Fähigkeit zur Produktion von Naturstoffen auswirken kann.

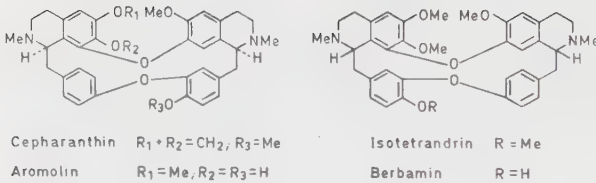


Abb. 31: Die Strukturformeln der Alkaloide Cepharanthin und Isotetrandrin und deren Vorstufen Aromolin und Berbamin aus Stephania cepharantha.

An Zellkolonien von Catharanthus roseus, die nach Plattieren aus Einzelzellen und Zellaggregaten einer Suspensionskultur herangewachsen waren, wurde zum ersten Mal eine quantitative Analyse der Verteilung biochemischer Varianten innerhalb einer umfangreichen Population (160 Kolonien) durchgeführt (ZENK et al., 1977). Diese Untersuchungen wurden erst durch Anwendung einer sehr empfindlichen und spezifischen Analysenmethode, des Radioimmunoassays, ermöglicht. Dabei wurde für die Ajmalicingehalte der Kolonien eine Variation von 0 - 0.8 % und für Serpentin von 0 - 1.4 % festgestellt, Unterschiede also, die nicht allein auf die genetische Variationsbreite zurückzuführen sind, sondern eventuell ein epigenetisches Phänomen anzeigen.

Bei diesen Untersuchungen war noch nicht berücksichtigt worden, ob sich die varianten Zellkolonien auch in der Aktivität der Enzyme ihrer Biosynthesewege oder im Gehalt der Alkaloidvorstufen unterscheiden. In weiterführenden Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Variationen der Alkaloidgehalte (Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) von Zellkolonien, die aus Zellen einer Suspensionskultur von Catharanthus roseus herangewachsen waren, den Mengen an zur Verfügung stehender Vorstufe (Loganin/Secologanin) und der Enzymaktivität der Strictosidin-Synthase, dem Schlüsselenzym der Indolalkaloidbiosynthese, gegenübergestellt. Da sowohl zur Bestimmung der Vorstufen- und Alkaloidgehalte als auch zum Erfassen der Enzymaktivitäten sehr empfindliche Analysemethoden zur Verfügung standen, war es möglich, diese Untersuchungen an sehr kleinen Gewebemengen auf dem Niveau der Zellkolonien selbst durchzuführen. Zuvor waren die zu testenden Kolonien (2 mm Durchmesser) unter sterilen Bedingungen geviertelt worden. Je ein Sektor der Zellkolonien wurde als Subkultur zu Kallusstämmen herangezogen. Durch Verwendung von Mikrotiterplatten als erste Kulturgefäße nach dem Teilen der Zellkolonien konnte die Kultivierung dieser sehr kleinen Gewebemengen - das durchschnittliche Trockengewicht eines Sektors betrug nur 0.76 mg - problemlos durchgeführt werden. Dadurch standen Zellen von Kolonien mit besonders interessanten Merkmalen auch nach Enzymtest und quantitativen Analysen der Inhaltsstoffe für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Nach radioimmunologischer Analyse der Gewebeextrakte konnte auch bei dieser Zellpopulation von Catharanthus roseus eine breite Streuung der Alkaloidgehalte (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) festgestellt werden. Eine der getesteten Zellkolonien hatte keines der untersuchten Alkaloide gebildet und nur wenig der Vorstufe Loganin/Secologanin akkumuliert.

Die spezifische Aktivität der Strictosidin-Synthase hatte bei diesen Zellen den niedrigsten von allen gemessenen Werten gehabt. Im Gegensatz zu der nicht-produzierenden Kolonie waren Vorstufengehalt und Enzymaktivität in der Kolonie mit dem höchsten gemessenen Alkaloidgehalt (1.0 %) sehr hoch. Auch bei allen anderen der 50 untersuchten Kolonien konnte eine Korrelation zwischen dem Gehalt der Vorstufe und den daraus abgeleiteten Indolalkaloiden festgestellt werden (vgl. Tabelle 1). Die Beziehung zwischen der Aktivität der Strictosidin-Synthase und den Produktgehalten der Kolonien war nicht so deutlich ausgeprägt, doch waren bei Kolonien mit überdurchschnittlich hoher Enzymaktivität auch die prozentualen Alkaloidgehalte weit höher (3 - 5mal) als die der Ausgangskultur.

An den hier untersuchten Kolonien von Catharanthus roseus konnte also das Auftreten varianter Zellen innerhalb einer Zellpopulation bestätigt werden. Aus einer Suspensionskultur, die 0,2 % Alkaloid (Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) gebildet hatte, wurden Zellstämme isoliert, die keines der hier untersuchten Produkte oder nur Spuren davon enthielt. Andere Stämme waren zu 5fach höherer Alkaloidbildung als der Ausgangsstamm fähig. Eine äußerlich homogen erscheinende Zellsuspension setzt sich also aus Zellen zusammen, deren Fähigkeit zur Synthese von Inhaltsstoffen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Höhe der Alkaloidbildung hängt dabei von der Bereitstellung der Vorstufe Loganin/Secologanin ab und wird durch die Enzymaktivität der Strictosidin-Synthase beeinflusst. Schon durch Untersuchung einer Zellpopulation lassen sich also Zellstämme isolieren, die zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen für die Bildung ihrer Inhaltsstoffe und deren Vorstufen fähig sind, und auf diese Weise Zellstämme selektieren, deren Alkaloidgehalt den der Ausgangskultur um ein Viel-

faches übertrifft. Dabei können nicht nur Zellstämme angelegt werden, deren Alkaloidbildung in der Gesamtheit erhöht ist, sondern es lassen sich gezielt Stämme isolieren, die nur eines der Alkaloide aus dem Muster der enthaltenen Inhaltsstoffe vermehrt produzieren. Dies ist ein Aspekt, der besonders im Hinblick auf die biotechnologische Nutzung pflanzlicher Zellkulturen interessant ist. Ein bestimmter Pflanzeninhaltsstoff kommt allgemein nicht als einziger Vertreter seiner Gruppe in pflanzlichem Gewebe vor, sondern wird von mehreren Stoffen mit ähnlichem Bauprinzip begleitet (STEINEGGER und HÄNSEL, 1972). Falls nur einer dieser Inhaltsstoffe aus dem Zellmaterial gewonnen werden soll, muß er in oft zeit- und kostenaufwendigen Prozessen von den unerwünschten Nebenprodukten getrennt werden. Durch Verwendung von Zellstämmen, die frei von solchen Nebenprodukten sind, dafür aber eine interessierende Substanz vermehrt produzieren, würde die Aufarbeitung des Zellmaterials erleichtert und die Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellkulturen effektiver gestaltet.

Zellen einer Population unterscheiden sich nicht nur in der Fähigkeit, die für die Synthese ihrer Inhaltsstoffe notwendigen Vorstufen selbst zu produzieren, sie variieren auch deutlich in der Möglichkeit, exogen angebotene Vorstufen zu metabolisieren und sie zur Bildung von Endprodukten zu verwenden. Die Applikation von Vorstufen ist eine gebräuchliche Methode, um die Produktbildung einer Zellkultur zu erhöhen und konnte in mehreren Fällen erfolgreich angewendet werden (RAO und PATEL, 1974; ZENK et al., 1975; ZENK et al., 1977). Eine besonders deutliche Förderung der Alkaloidbildung durch Zugabe von Tryptophan konnte an Suspensionskulturen von Phaseolus vulgaris beobachtet werden (VELIKY und BARBER, 1975). In Vorstufen-freiem Medium wurden

die Alkaloide Harman und Norharman nur spurenweise gebildet. Wurde dem Medium Tryptophan zugesetzt, konnte ein deutlicher Anstieg der Harman- (ca. 30fach) und Norharmanbildung (ca. 40fach) der Zellen gemessen werden.

Tryptophan war auch unter mehreren getesteten Vorstufen außer Loganin die einzige Substanz gewesen, die eine deutliche Steigerung der Indolalkaloidbildung durch Zellkulturen von Catharanthus roseus bewirkt hatte (ZENK et al., 1977). Das biogene Amin dieser Aminosäure, das Tryptamin, wirkte sich dagegen sowohl auf Wachstum als auch auf die Alkaloidbildung negativ aus. Dieses Ergebnis war auch von einer anderen Arbeitsgruppe erzielt worden (DÖLLER et al., 1976), allerdings war bei den dort verwendeten Kalluskulturen von Catharanthus roseus die Serpentinbildung durch Zugabe von Tryptophan um mehr als 60 % gesenkt worden. Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit an Zellkolonien oder isolierten Zellstämmen einer Population von Catharanthus roseus durchgeführt wurden, konnten die widersprüchlichen Ergebnisse nach Applikation von Tryptophan erklären. Selbst Zellen einer Population unterscheiden sich deutlich in ihrer Fähigkeit, exogen angebotenes Tryptophan oder Tryptamin zur erhöhten Produktion der Indolalkaloide Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin zu verwenden. Es ließen sich Zellstämme isolieren, bei denen nach Zugabe von Tryptophan ein drastischer Anstieg der Alkaloidbildung zu verzeichnen war. Dieser positive Tryptophan-effekt konnte sowohl bei Zellkolonien, Kallusstämmen und nach mehreren Passagen an daraus angelegten Suspensionskulturen festgestellt werden. Tryptophan hatte auch teilweise einen positiven Effekt auf das Zellwachstum ausgeübt. Erhöhte Alkaloidgehalte waren aber nicht auf einen Wachstumseffekt zurückzuführen, da unter dem Einfluß von Tryptophan bei gleicher Produktion von Zellmasse eine

4fache Steigerung der Alkaloidproduktion gemessen werden konnte. Die exogen zugegebene Vorstufe hatte also direkt die Biosynthese der Indolalkaloide beeinflusst. Die gleiche Wirkung konnte auch bei Applikation von Tryptamin beobachtet werden. Aus einer Zellpopulation konnten Stämme isoliert werden, die erst nach Zugabe von Tryptamin zur effektiven Alkaloidbildung fähig waren. Aus der gleichen Zellpopulation waren aber auch andere Stämme selektiert worden, bei denen die Alkaloidproduktion unter dem Einfluß von Tryptamin um mehr als 50 % niedriger war, ein Effekt, der auch bei einigen der untersuchten Zellstämme nach Tryptophan-Applikation festgestellt wurde.

Innerhalb einer Population von Catharanthus roseus existieren also Zellen, die eine angebotene Vorstufe aufnehmen und metabolisieren können und dadurch zur gesteigerten Produktion ihrer Inhaltsstoffe befähigt sind. Diese Zellen sind möglicherweise nicht selbst in der Lage, ausreichende Mengen der notwendigen Vorstufen bereitzustellen, so daß ihre Produktionskapazität erst durch zusätzlich exogen applizierte Verbindungen effektiv genutzt werden kann. Andererseits sind in der gleichen Population Zellen vorhanden, die selbst in der Lage sind, einen hohen Vorstufengehalt zu produzieren und daher auch hohe Produktbildung aufweisen. Ihre Synthesefähigkeit wird durch zusätzliche Applikation von Tryptamin oder Tryptophan gehemmt. Es ist denkbar, daß dabei die Kondensation von Tryptamin und Secologanin negativ beeinflusst wird, da die Reaktionsgeschwindigkeit der Strictosidin-Synthase durch ein Überangebot ihres Substrates Tryptamin gehemmt werden kann (TREIMER, 1979). Zellstämme, deren Strictosidin-Synthase besonders unempfindlich gegenüber einer Substrathemmung ist, oder Stämme, die die angebotenen Vorstufen sehr schnell meta-

bolisieren, ohne sie bis zu hemmenden Konzentrationen zu akkumulieren, wären von besonderem Vorteil für die biotechnologische Nutzung der kultivierten Catharanthus-Zellen. Sind solche Zellstämme bereits in Vorstufen-freiem Medium zu hoher Alkaloidproduktion fähig, können sie nach zusätzlicher Applikation von Vorstufen zu über-durchschnittlicher Produktbildung angeregt werden. Wäh-rend der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Un-tersuchungen konnte ein Zellstamm von Catharanthus roseus isoliert werden, der die oben genannten Eigenschaften besitzt. In Tryptophan-freiem Produktionsmedium hatte sein Gewebe bereits 112 mg/l Alkaloide (Summe von Ser-pentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) gebildet. Durch Zugabe von Tryptophan konnte seine Alkaloidproduk-tion bis auf den überdurchschnittlichen Gehalt von 480 mg/l gesteigert werden. Bei anderen Zellstämmen der gleichen Population, die auch im Medium ohne Tryptophan hohe Al-kaloidgehalte aufwiesen, wurde die Alkaloidbildung da-gegen durch exogenes Tryptophan stark gehemmt.

Zellstämme von Catharanthus roseus sind also nicht gene-rell in der Lage, die ihnen angebotenen Vorstufen zur gesteigerten Produktion von Indolalkaloiden zu nutzen. Dies erklärt die widersprüchlichen Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Tryptophanwirkung auf Zellkulturen von Catharanthus roseus erhalten worden waren. Auch die hemmende Wirkung des Tryptamins auf die Alkaloidbildung (DÖLLER et al., 1976; ZENK et al., 1977) darf nicht als allgemeines Phänomen angesehen werden, sondern war ein Charakteristikum der Zellstämme, die für die früher durchgeführten Versuche verwendet worden waren. Die sehr unterschiedlichen Reaktionen der Zellstämme von Catharan-thus roseus auf die Zugabe der Vorstufen Tryptamin und Tryptophan, die bei Untersuchungen für die vorliegende Arbeit festgestellt wurden, verdeutlichen ebenfalls, welche Variationsmöglichkeiten die Stoffwechselleistungen

von Zellen bereits innerhalb einer Population bieten können.

TABATA und HIRAOKA (1976) hatten bereits darauf hingewiesen, daß für das Auftreten varianter Zellstämme genetische oder cytoplasmatische Veränderungen der Zellen verantwortlich sein müssen. In vielen Fällen wurde an kultivierten Pflanzenzellen eine drastische Veränderung der Chromosomenzahl gegenüber dem diploiden Chromosomensatz der differenzierten Pflanze beobachtet (BAYLISS, 1973; BLAKELY und STEWARD, 1964; SINGH und HARVEY, 1975 a, 1975 b; COOPER et al., 1964; HIRAOKA und TABATA, 1974). Außer der Instabilität der Chromosomenzahl wurden zahlreiche andere Anomalien wie Chromatidenbrüche, Pseudochiasmata oder Fragmentation von Chromosomen festgestellt, die besonders nach langer Kultivierungsdauer auftraten und zu großer Heterogenität der chromosomalen Ausstattung kultivierter Zellen geführt hatten. Solche aberranten Zellen sollten zu varianten biochemischen Leistungen fähig sein, da durch veränderte Chromosomenzahl Gene zur Codierung von Enzymen des Zellstoffwechsels fehlen oder auch vervielfältigt sein können.

Durch Chromosomenuntersuchungen an Wurzelspitzenzellen und kultivierten Zellen varianter Stämme von Catharanthus roseus konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hinweise für das Auftreten biochemisch varianter Zellstämme erhalten werden. Während bei Wurzelspitzenzellen der differenzierten Pflanze konstant die charakteristische Chromosomenzahl von $2n = 16$ der diploiden Zellen festgestellt wurde (vgl. Abbildung 16 A), waren nur 0,5 % aller untersuchten kultivierten Zellen diploid geblieben. Im Laufe zweijähriger Kultivierung hatte sich das ursprünglich diploide Gewebe wesentlich verändert. Durch Vervielfältigung oder auch durch Fragmentation von Chro-

mosomen waren Zellen entstanden, deren Chromosomenzahl deutlich erhöht war. Die höchste der festgestellten Chromosomenzahlen betrug 81, diese Zelle war also mehr als decaploid (10 n). Bei Vergleich der durchschnittlichen Chromosomenzahl der Zellen mit der Fähigkeit zur Alkaloidproduktion des untersuchten Zellstammes konnte eine negative Korrelation zwischen Chromosomenzahl und den Alkaloidgehalten festgestellt werden. Hochpolyploide Zellen waren nur zu geringer Alkaloidproduktion fähig. Da die Vervielfältigung der Chromosomen während der Kultivierung der Zellen sehr unregelmäßig war und selten Vervielfachung des ganzen Chromosomensatzes auftrat, kann nicht generell erwartet werden, daß durch Erhöhen der Chromosomenzahl einer kultivierten Zelle auch die Gene zur Bildung der Inhaltsstoffe vermehrt in der Zelle vorhanden sind, und sie dadurch zu erhöhten Syntheseleistungen fähig sind. Ob die hier an fünf ausgewählten Stämmen festgestellte niedrige Alkaloidbildung bei Zellen mit hohen Chromosomenzahlen ein allgemein gültiges Prinzip für Zellkulturen von Catharanthus roseus ist, kann erst durch Untersuchung einer größeren Anzahl varianter Stämme mit Sicherheit angenommen werden. Die hohe Instabilität der Chromosomenzahl im Laufe der Kultivierung und das Auftreten von sehr unterschiedlichen Chromosomenzahlen selbst bei Zellen einer Suspensionskultur (vgl. Abbildung 17 A und B) zeigen, daß für variante Zellen mit verschiedenen biochemischen Charakteristika chromosomale Veränderungen verantwortlich sein müssen. Da diese Veränderungen erst im Laufe der Kultivierung eintreten (HIRAOKA und TABATA, 1974; BAYLISS, 1973; COOPER et al., 1964; diese Arbeit), sind vermutlich Substanzen (z.B. Phytohormone, Cocosmilch) im Kulturmedium für die Chromosomenaberrationen verantwortlich. In der differenzierten Pflanze sind Zellen, deren Chromosomenzahl vom normalen diploiden Satz abweichen, äußerst selten. BLAKELY und STEWARD

(1964) vermuteten, daß Zellen mit Chromosomenaberrationen in der differenzierten Pflanze nicht existieren können, aber isoliert in Kulturmedium gehalten eine größere Überlebenschance haben.

Ein Problem, das in diesem Zusammenhang auch betrachtet werden muß, ist die Instabilität von Zellstämmen in Bezug auf Wachstum und Sekundärstoffproduktion. Bei einem gut produzierenden Zellstamm kann die Fähigkeit zur Sekundärstoffbildung im Laufe der Kultivierung starken Schwankungen unterliegen oder vollständig verlorengehen (TABATA und HIRAOKA, 1976; DEUS, 1977). Als Ursachen wurden bei Zellstämmen von Catharanthus roseus zeitweise Überwiegende Abbaureaktionen oder Regulationsdefekte in den Synthesewegen limitierender Vorstufen oder der Indolalkaloide selbst angenommen (DEUS, 1977). Auch ein epigenetisches Phänomen bei der Zellteilung könnte für die Variationen der Produktivität verantwortlich sein. Sind die für die Sekundärstoffsynthese zuständigen Gene nicht auf den Chromosomen des Zellkerns, sondern extrachromosomal lokalisiert, werden sie nicht nach den mitotischen Gesetzmäßigkeiten auf die Tochterzellen verteilt. Diese Zellen könnten sich genetisch erheblich unterscheiden und als Folge davon in ihrem biochemischen Potential differieren.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an Suspensionskulturen von Catharanthus roseus hatte gezeigt, daß die Fluoreszenzintensität der Zellen stark variierte (vgl. Kapitel III.2.1.). Selbst Zellen einer Zellkette wiesen deutliche Unterschiede der Fluoreszenzintensität auf, ihre Fähigkeit zur Bildung der fluoreszierenden Inhaltsstoffe war also verschieden (vgl. Abbildung 2). Diese extreme Variation von Zellen, die durch Teilung hervorgegangen sind, können nicht durch gleichmäßige Aufteilung der Erbinformation bei normaler chromosomaler Ver-

erbung erklärt werden. Daher wurde bislang angenommen, daß die Alkaloidbildungsfähigkeit von kultivierten Catharanthus-Zellen epigenetisch vererbt wird (ZENK et al., 1977; ALFERMANN und REINHARD, 1978). Die cytologischen Untersuchungen an Zellen verschiedener Stämme von Catharanthus roseus während dieser Arbeit haben jedoch ergeben, daß im Laufe der Kultivierung sehr unregelmäßige Vervielfältigung der Chromosomen stattgefunden hatte. Außerdem konnten morphologische Veränderungen, z.B. sehr kleine Chromosomen oder Chromosomenfragmente in den Zellen der Suspensionskulturen festgestellt werden. Es ist unwahrscheinlich, daß diesen varianten Zellen normale mitotische Teilung mit gleichmäßiger Verteilung der Chromosomen möglich ist. Denkbar ist dagegen, daß in der Anaphase besonders Chromosomenfragmente unregelmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Auf diese Weise können auch durch chromosomale Vererbung der Alkaloidsynthesefähigkeit Zellen entstehen, die in ihrem biosynthetischen Potential deutlich variieren. Diese varianten Zellen können im Laufe der Kultivierung beim Gewebetransfer unregelmäßig auf die Subkulturen verteilt werden und so Schwankungen der Produktivität einer Zellkultur verursachen. Außerdem ist es möglich, daß sich einige dieser varianten Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen bevorzugt entwickeln können. An Kalluskulturen von Picea glauca wurde z.B. beobachtet, daß die Wachstumsrate der Zellen positiv mit der Chromosomenzahl korreliert war (SINGH und HARVEY, 1975 b). Dieser Vorteil polyploider Zellen führte im Laufe der Kultivierung zu einer allmählichen Entwicklung polyploider Kalluskulturen. Ein kontinuierlicher Selektionsdruck für gut wachsende aber wenig Sekundärstoff bildende Zellen könnte zu einem Verlust der Produktionsfähigkeit von Zellkulturen führen (ALFERMANN und REINHARD, 1978).

Neben Zellstämmen, die durch die Instabilität ihrer Produktbildung auffallen und zu denen Catharanthus roseus (ZENK et al., 1977) und Nicotiana tabacum (TABATA und HIRAOKA, 1976) gehören, gibt es einen zweiten Typ von Zellstämmen, die auch während langjähriger Kultivierung stabile Produktionsfähigkeit zeigen. Zu diesen Stämmen gehören u.a. Coleus blumei (ZENK et al., 1977) und Morinda citrifolia (ZENK et al., 1975). Während siebenjähriger Kultivierung (180 Passagen) von Morinda citrifolia Suspensionskulturen in Naphthylsigsäure-haltigem Medium traten keine Schwankungen der Anthrachinonproduktion auf. Parallel dazu wurde der Stamm in 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-haltigem Medium kultiviert und die Anthrachinonbildung dadurch vollständig unterdrückt (ZENK et al., 1975). Nach zweijähriger Kultivierung in 2,4-D-haltigem Medium wurden diese Zellen in Naphthylsigsäure-haltigem Medium übertragen und waren nach 1 - 2 Passagen wieder zur normalen Anthrachinonbildung fähig. Das zeigt deutlich, daß der Verlust der Anthrachinonproduktion in 2,4-D-haltigem Medium nicht von Chromosomenaberrationen hervorgerufen worden war. Durch Analyse der DNS-Gehalte beider Stämme stellte man fest, daß auch nach 8jähriger Kultivierung kein Unterschied zum DNS-Gehalt von Wurzelspitzenzellen der differenzierten Pflanze bestand (ZENK, 1978 a). Das zeigt eindeutig, daß die konstante Produktion der Inhaltsstoffe mit der genetischen Stabilität dieser diploiden Zellkulturen korreliert war.

Die Stabilität einer hochproduzierenden Zellkultur ist eine wesentliche Voraussetzung um sie zur Gewinnung ihrer Inhaltsstoffe auch im biotechnologischen Maßstab nutzen zu können. Häufig wird eine interessierende Substanz aber von Zellstämmen gebildet, deren Produktionsfähigkeit im Laufe der Kultivierung verlorenggeht. Durch Selektion von varianten gut produzierenden Zellklonen aus dieser Popu-

lation kann die ursprüngliche Produktionsfähigkeit des Zellstammes zurückgewonnen und sogar gegenüber der Ausgangskultur gesteigert werden (ZENK, 1978 a). Dies ist problemlos möglich, wenn die gesuchte Substanz intensiv gefärbt ist, und Zellkolonien mit hoher Produktionsfähigkeit aufgrund der Pigmentierung erkannt werden können (STÄRK et al., 1976; CONSTABEL, 1967; TABATA et al., 1976). Technisch aufwendiger ist die Selektion von Zellkolonien, deren Inhaltsstoffe ungefärbt sind, da ein unterschiedlicher Sekundärstoffgehalt nicht optisch in Erscheinung tritt. Ein entscheidender Fortschritt wurde auf diesem Gebiet durch Anwendung des Radioimmuntests gemacht, der eine sehr empfindliche, spezifische und schnelle Gehaltsbestimmung in einer großen Anzahl von Proben ermöglicht und daher besonders für das "Screening" von Zellpopulationen kultivierter Zellen geeignet ist. Für die Gehaltsanalysen ist allerdings die Extraktion der Gewebeproben notwendig, die Aufarbeitung kann daher besonders bei großer Probenzahl trotzdem noch zeitraubend sein. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte optische Selektionsmethode mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie hat den Vorteil, daß keinerlei Aufarbeitungs- oder Analysenschritte vor der Selektion notwendig sind. Durch geeignete Fluoreszenzanregung lassen sich die Inhaltsstoffe in den Zellen selbst sichtbar machen. Die dabei beobachtete Fluoreszenzintensität ist ein geeignetes Merkmal, um gut produzierende Zellkolonien aufzufinden und es kann sofort entschieden werden, welche der Kolonien zur Subkultivierung geeignet sind. Auf diese Weise ließen sich aus einer sehr umfangreichen Population von Zellkolonien (ca. 230 000) innerhalb kürzester Zeit intensiv fluoreszierende Kolonien, d.h. hoch produzierende Stämme von Catharanthus roseus isolieren. Da die Selektion auch unter sterilen Bedingungen problemlos durchführbar war, wurden aus den selektierten Kolonien Zellstämme etabliert, die überdurchschnitt-

lich Alkaloidgehalte (Summe aus Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) produzieren. Maximale Alkaloidbildung wurde bei Stamm 1/10 mit 418 mg/l gemessen

Die fluoreszenzmikroskopische Selektionsmethode ist vielseitig anwendbar. An Hand der Fluoreszenzintensität der Zellen kann überprüft werden, ob ihre Sekundärstoffsynthese nach Zugabe einer Vorstufe gefördert oder gehemmt wird. Auf diese Weise konnten aus Zellpopulationen von Catharanthus roseus Stämme isoliert werden, die appliziertes Tryptamin oder Tryptophan zu deutlich gesteigerter Alkaloidproduktion nutzen können. Hochproduzierende Zellstämme können danach im Laufe der Kultivierung durch einfache mikroskopische Untersuchungen kontinuierlich überprüft werden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ermöglichen nicht nur quantitative Unterschiede des Sekundärstoffgehaltes der Zellen festzustellen, es lassen sich auch gezielt Zellstämme isolieren, die in der Qualität der gebildeten Produkte deutlich verschieden sind. Aus sehr heterogenen Zellpopulationen einiger Eschscholtzia-Arten wurden Zellstämme isoliert, die im Muster der Inhaltsstoffe differierten. Auch nach einer mehr als einjährigen Kultivierung hatten diese varianten Stämme ihre spezifischen Charakteristika beibehalten. Durch Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie können also aus einer heterogenen Zellpopulation Stämme selektiert werden, die besonders durch die Stabilität ihrer Produktbildung gekennzeichnet sind.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnten nicht nur bei Zellen von Catharanthus roseus, sondern auch erfolgreich an Zellen anderer Pflanzenarten (Ruta, Eschscholtzia) mit sehr unterschiedlichen Inhaltsstoffen (Acridin-, Isochinolinalkaloide) durchgeführt werden. Prinzipiell kann diese optische Selektionsmethode bei Zellen jeder Pflanzenart eingesetzt werden, sofern

sie Inhaltsstoffe produzieren, die bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge fluoreszieren. Dabei werden nicht nur Fluoreszenzunterschiede großer Zellaggregate oder Zellkolonien erfaßt, es können sogar Unterschiede zwischen einzelnen Zellen festgestellt werden (vgl. Abbildung 2). Das bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen oder Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch zu selektieren und durch Anwendung einer geeigneten Kulturtechnik zu klonieren. Dabei kann die Fluoreszenz der Tochterzellen kontinuierlich untersucht und ihre Fähigkeit zur Bildung der Inhaltsstoffe verfolgt werden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für die Fluoreszenzmikroskopie wäre das Erkennen von Produkten der Protoplastenfusionierung. Werden Protoplasten verschiedener Herkunft fusioniert, müssen sie sich durch ein Merkmal (Pigmentierung, Chlorophylldefizienz) deutlich unterscheiden, damit Fusionsprodukte leicht erkannt werden können (SCHIEDER, 1976). Es könnten auch morphologisch gleich gestaltete Protoplasten zur Fusion verwendet werden, wenn die Fusionspartner Inhaltsstoffe enthalten, deren Fluoreszenzfarben deutlich verschieden sind. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung könnten solche Fusionsprodukte leicht aufgefunden werden.

Es gibt also viele Möglichkeiten, die Fluoreszenzmikroskopie für Untersuchungen an kultivierten Pflanzenzellen einzusetzen. Ein gewisser Nachteil besteht darin, daß keine direkte quantitative Bestimmung der Sekundärstoffe in den Zellen möglich ist. Außerdem kann keine spezifische Untersuchung der Inhaltsstoffe durchgeführt werden, da immer die Gesamtheit aller in der Zelle enthaltenen Substanzen erfaßt wird. Eine spezifische und quantitative Analyse wird jedoch durch den Radioimmunoassay ermöglicht, die Kombination von fluoreszenzmikroskopischer Selektion mit der anschließenden radioimmunologischen Untersuchung der selektierten Zellen ist also eine hoch geeignete

"Sreening-Methode", um aus sehr umfangreichen Zellpopulationen hochproduzierende Zellstämme zu isolieren.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde auch zur Untersuchung von Zellstämmen von Catharanthus roseus eingesetzt, die sich gegen das Aminosäureanalogon 5-Methyltryptophan als resistent erwiesen hatten. SCHALLENBERG und BERLIN (1979) berichteten, daß es ihnen ebenfalls gelungen war, 5-Methyltryptophan resistente Zellstämme von Catharanthus roseus zu isolieren. Diese Stämme hatten verstärkt Tryptophan akkumuliert, ihre Indolalkaloidbildung war dadurch aber nicht gefördert worden. Die Frequenz, mit der Regulationsmutanten nach Behandlung mit einem Aminosäureanalogon zu erwarten sind, ist sehr gering (WIDHOLM, 1977). Daher muß eine sehr umfangreiche Zellpopulation getestet werden, um Regulationsmutanten mit erhöhter Produktbildung auffinden zu können. Die Fluoreszenzmikroskopie konnte auch bei diesen Untersuchungen erfolgreich angewendet werden. Mit dieser Methode konnte eine sehr große Anzahl von Zellen ($1,6 \times 10^7$) nach Behandlung mit Methyltryptophan innerhalb kurzer Zeit (ca. 10 Std.) untersucht werden und dabei resistente Zellen mit deutlich erhöhtem Alkaloidgehalt erkannt werden. Auf diese Weise wurden resistente Zellstämme von Catharanthus roseus isoliert, deren Alkaloidgehalte gegenüber der unbehandelten Ausgangskultur wesentlich erhöht waren. Die Resistenz der Zellstämme hatte sich auch nach mehreren Passagen auf Hemmstoff-freiem Medium als stabil erwiesen; die Frequenz, mit der diese resistenten Zellstämme auftraten, war sehr gering (8×10^{-6}). Beides sind gewisse Hinweise darauf, daß es sich bei den hier selektierten Stämmen wirklich um Mutanten handeln könnte. Die erfolgreiche Selektion dieser Mutanten war erst durch Einsatz der neue entwickelten optischen Selektionsmethode

möglich gewesen. Dieses Beispiel zeigt, welche Bedeutung die Wahl einer geeigneten Selektionsmethode hat, wenn aus einer Zellpopulation variante Stämme mit erhöhter Sekundärstoffproduktion isoliert werden sollen.

Variante Zellstämme von Catharanthus roseus unterscheiden sich nicht nur in der Höhe der Alkaloidspeicherung. Unter identischen Kulturbedingungen können der Verlauf der Wachstumskurve, die gebildete Zellmasse und das zeitliche Auftreten maximaler Alkaloidgehalte sehr differieren. Die Bildung von Serpentin, Ajmalicin oder Tetrahydroalstonin kann gleichzeitig innerhalb des Kulturzyklus stattfinden, oder zeitlich deutlich voneinander getrennt sein. Für die Gewinnung von Sekundärstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen kann die zeitliche Trennung der maximalen Gehalte einzelner Inhaltsstoffe während der Kultivierung Vor- und Nachteile haben. Sollen optimale Ausbeuten von mehreren Produkten gleichzeitig erzielt werden, wird es schwierig sein, einen günstigen Zeitpunkt zum Ernten der Zellen zu finden, da die höchsten Gehalte der Inhaltsstoffe nicht gleichzeitig erfaßt werden können. Andererseits kann durch richtige Wahl der Kulturdauer die Akkumulation eines unerwünschten Nebenproduktes in den Zellen vermieden werden. In beiden Fällen sind kinetische Untersuchungen an den verwendeten Zellstämmen unerlässlich, um genaue Kenntnis von dem zeitlichen Ablauf ihrer Sekundärstoffbildung zu erhalten. Darüber hinaus können Untersuchungen von Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Kulturdauer Einblicke in die Regulation der Sekundärstoffbildung einer Zellkultur geben.

Die Bildung der Indolalkaloide in Zellen von Catharanthus roseus verläuft über mehrere Zwischenprodukte in einem sehr komplexen Biosyntheseweg, dessen Schritte von spezifisch wirksamen Enzymen katalysiert werden. An einem ausgewählten Stamm von Catharanthus roseus wurde das

zeitabhängige Auftreten von Enzymaktivitäten zur Bildung von Zwischen- und Endprodukten der Indolalkaloidbiosynthese untersucht. Die Strictosidin-Synthase, das Schlüsselenzym des Biosyntheseweges (TREIMER und ZENK, 1979 b) läßt sich sehr früh, bereits nach eintägigem Wachstum in den Zellen nachweisen und erreicht am 8. Kulturtage ihr Aktivitätsmaximum. Mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung zum Maximum der Strictosidin-Synthase Aktivität fand die Produktbildung der Zellen statt. In Abhängigkeit vom Alter der Suspensionskultur variierte das Verhältnis der in zellfreiem System gebildeten Mengen von Cathenamin, Ajmalicin, 19epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin. Die Enzymaktivitäten für die Bildung von Zwischenstufe und Endprodukte treten also nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Kulturzyklus einer Zellkultur auf und sind streng miteinander koordiniert.

Erste Untersuchungen zur Biosynthese der Indolalkaloide wurden in vivo mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen an differenzierten Pflanzen durchgeführt. Ein wesentlicher Fortschritt für das Studium von Biosynthesewegen und ihrer Regulation war die Anwendung von zellfreien Extrakten aus Kalluszellen (SCOTT und LEE, 1975) und besonders aus Zellen von Suspensionskulturen (STÖCKIGT et al., 1976) von Catharanthus roseus. Das von STÖCKIGT und Mitarbeitern (1976) entwickelte System war in Hinblick auf die Produktbildung pro mg Protein 1000fach effektiver als das in vivo System mit differenzierten Pflanzen. Dieses Beispiel zeigt den großen Vorteil pflanzlicher Zellkulturen für enzymatische Untersuchungen und Aufklärung von Biosynthesewegen. Zellfreie Systeme aus Catharanthus roseus Suspensionskulturen haben weitgehend zur Aufklärung des Biosyntheseweges der Indolalkaloide beigetragen (STÖCKIGT et al., 1976; STÖCKIGT

et al., 1977; STÖCKIGT und ZENK, 1977; STÖCKIGT 1979; NAGAKURA et al., 1979; TREIMER und ZENK, 1978; HEMSCHIEDT und ZENK, 1980). Zur Charakterisierung spezifischer Enzyme des Biosyntheseweges (TREIMER und ZENK, 1979 b; HEMSCHIEDT, 1979) ist es günstig, den Zeitpunkt ihrer höchsten Aktivität innerhalb des Kulturzyklus zu erfassen. Daher sind zeitabhängige Untersuchungen der enzymatischen Aktivitäten des verwendeten Zellmaterials notwendige Voraussetzung, um eine Enzymisolierung und Charakterisierung optimal durchführen zu können. Um den richtigen Zeitpunkt zum Aufarbeiten des Gewebes erfassen zu können, wäre es sehr hilfreich, wenn der Zeitpunkt maximaler Enzymaktivität mit deutlichen Veränderungen des Mediums (pH-Wert, Leitfähigkeit, Saccharosegehalt etc.) korreliert wäre. An Suspensionskulturen von Glycine max konnte z.B. gezeigt werden, daß der Zeitpunkt der maximalen Phenylalanin Ammonium Lyase Aktivität mit dem Verbrauch stickstoffhaltiger Nährstoffe im Medium zusammentraf (HAHLBROCK et al., 1974).

Während der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurde festgestellt, daß die Zeitpunkte maximaler Enzymaktivität für die Bildung der Indolalkaloide mit der Änderung der Leitfähigkeit des Mediums korreliert sind. Zu dem Zeitpunkt, an dem gerade eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit festzustellen war, wurde die höchste Enzymaktivität zur Bildung von Tetrahydroalstonin gemessen. Die maximale Enzymaktivität zur Synthese von Ajmalicin wurde jedoch erst festgestellt, nachdem die Leitfähigkeit ihr Minimum erreicht hatte. Die kontinuierliche Leitfähigkeitsmessung während der Kultivierung eines Zellstammes ist somit eine einfache und schnelle Methode, um den richtigen Zeitpunkt zum Aufarbeiten des Gewebes zu erfassen, wenn

man Zellmaterial gewinnen will, das sich durch hohe Aktivität eines gewünschten Enzyms auszeichnet. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von HAHLBROCK und Mitarbeitern (1974), die an Suspensionskulturen von Glycine max erzielt worden waren.

Durch Induktion oder Repression von Stoffwechselwegen können pflanzliche Hormone die Bildung von Inhaltsstoffen kultivierter Zellen beeinflussen (TABATA et al., 1971; ALFERMANN und REINHARD, 1971). Sind die Zwischenstufen des Biosyntheseweges bekannt, so kann die Wirkung von Hormonen auf die Bereitstellung von Stoffwechselmetaboliten untersucht und mit den unter diesen Bedingungen in den Zellen angereicherten Produkten in Beziehung gesetzt werden. Durch derartige Untersuchungen können sich Hinweise auf den Wirkungsort der verwendeten Hormone innerhalb des Biosyntheseweges ergeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß von verschiedenen substituierten Phenoxyessigsäuren auf die Loganin/Secologanin- und die Indolalkaloidbildung von Catharanthus roseus Suspensionskulturen untersucht. Die verschiedenen Effektoren hatten deutlichen Einfluß auf Wachstum, Vorstufen- und Produktbildung der verwendeten Zellen gehabt. Ein allgemeiner Effekt dabei war die Korrelation der Wirkung auf den Gehalt der Vorstufe und den daraus gebildeten Alkaloiden. Ein positiver Effekt auf den Gehalt und die Speicherung der Vorstufe Loganin/Secologanin war mit einer gesteigerten Produktbildung verbunden. Umgekehrt war der Alkaloidgehalt der Zellen niedrig, wenn die Synthese der Vorstufe durch den zugesetzten Effektor gehemmt worden war. Die Substituierung der Phenoxyessigsäuren hatte teilweise gleiche Effekte auf die Loganin/Secologanin- und Indolalkaloidbildung ausgeübt, wie sie schon bei der Anthrachinonsynthese von

Morinda citrifolia beobachtet worden waren (SCHULTE, 1978). Da so verschiedene Biosynthesewege gleichermaßen beeinflußt wurden, greifen die hier verwendeten Effektoren vermutlich sehr früh, eventuell bereits in den Primärstoffwechsel der Zellen ein. Durch Untersuchung der Enzymaktivität der Strictosidin-Synthase unter dem Einfluß der verschieden substituierten Phenoxyessigsäuren konnte bereits ausgeschlossen werden, daß die Regulation der Indolalkaloidbildung an dem Schlüsselenzym des Biosyntheseweges eingreift (SEIPEL, 1979).

Die Reaktion der Catharanthus roseus Zellen auf die Applikation der Effektoren gibt aber nicht nur Auskunft über deren regulatorische Wirkung. Die Ergebnisse zeigen gleichermaßen wie sehr die Produktbildung einer Zellkultur von der Hormonzusammensetzung des Mediums beeinflußt wird. Unter dem Einfluß verschieden substituierter Phenoxyessigsäuren waren im Extremfall bei den Loganin/Secologaningehalten ein Unterschied um den Faktor 120, bei den gebildeten Produkten um den Faktor 20 zu verzeichnen. Die Potenz zur hohen Produktion von Inhaltsstoffen war also in den Zellen vorhanden, konnte aber erst durch den Einfluß eines geeigneten Effektors verwirklicht werden. Die Wahl einer optimalen Hormonzusammensetzung im Medium ist daher eine wesentliche Voraussetzung für die effektive Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellkulturen.

Pflanzenzellen, die als homogene Suspension wachsen, können experimentell ähnlich behandelt werden wie Bakterienkulturen und so ließen sich Methoden der Mikrobiologie auch erfolgreich an pflanzlichen Zellkulturen anwenden (BERGMANN, 1960; SCHULTE, 1978; PALMER und WIDHOLM, 1975). An Mikroorganismen wurde auch die Methode, ganze Zellen zur Steigerung ihrer Produktivität in einer festen Matrix

zu immobilisieren, erfolgreich angewendet (AZERAD et al., 1980, CHIBATA et al., 1976) und konnte sogar zur Produktion von mikrobiellen Naturstoffen im industriellen Maßstab eingesetzt werden (CHIBATA et al., 1976). Immobilisierte Zellen haben sich besonders während langer Prozeßdauer im kontinuierlichen Verfahren als sehr stabil erwiesen, so daß die Effektivität biotechnologischer Verfahren erheblich gesteigert werden konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal auch kultivierte Pflanzenzellen immobilisiert und die Stoffwechselfähigkeiten eingeschlossener Zellen untersucht werden. Die Immobilisierung wurde besonders durch die Verwendung von Na-Alginat als Matrix begünstigt. Dieses Biopolymer ermöglicht durch seine gute Zellverträglichkeit und durch die leichte Handhabung und Formgebung einen schonenden Einschluß der Zellen. Durch die im Polymerisat enthaltenen Poren ist ein Stoffaustausch zwischen Zellen und Kulturmedium möglich. Die Immobilisierung kann problemlos unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden, ein wichtiges Kriterium für Langzeitversuche. Unter dem Einfluß des Alginatgels waren die metabolischen Fähigkeiten der Zellen vollständig auch über einen längeren Zeitraum erhalten geblieben. Ebenso wie frei suspendierte Zellen waren sie zu de novo Synthese ihrer Inhaltsstoffe, zur Produktbildung aus applizierten Vorstufen und zur Biotransformation fähig. Dabei konnten an den immobilisierten Zellen einige positive Effekte beobachtet werden. Während der im kontinuierlichen System von immobilisierten Catharanthus-Zellen durchgeführten Indolalkaloidbildung aus applizierten Vorstufen wurden die Produkte in das Medium abgegeben. Dieser Effekt war offensichtlich auf eine Permeabilitätsänderung der Zellmembranen durch Spuren von Chloroform im Medium zurückzuführen. Trotzdem waren die Zellen weiterhin zur Regeneration endogener Cofaktoren fähig. Die

Abgabe der Inhaltsstoffe in das Medium ist besonders für die biotechnologische Nutzung pflanzlicher Zellen interessant. Die gebildeten Produkte können in einem Reaktorsystem durch Aufarbeitung des Mediums gewonnen werden. Dabei ist ein Extrahieren der Zellen zum Gewinnen der Inhaltsstoffe unnötig, so daß ihre Produktionsfähigkeit kontinuierlich erhalten bleibt und genutzt werden kann. Außerdem könnte eine eventuell eintretende Endprodukthemmung der Naturstoffbiosynthese in den Zellen vermieden werden.

Immobilisierte Zellen von Catharanthus roseus zeigen eine Modifikation in der Synthese ihrer Inhaltsstoffe. 19epi-Ajmalicin ist bisher nicht als Inhaltsstoff differenzierter Pflanzen oder Zellkulturen von Catharanthus roseus nachgewiesen worden (SVOBODA, 1975), wird aber durch zellfreie Präparationen aus Suspensionskulturen (STÖCKIGT et al., 1976) oder von Protoplasten (diese Arbeit) von Catharanthus roseus aus applizierten Vorstufen gebildet. Eine Aussage über die Regulation, die dieser modifizierten Synthese zugrunde liegt, kann an dieser Stelle nicht gemacht werden. Die Tatsache, daß Zellen unter dem Einfluß der Immobilisierung zu geänderter Produktbildung befähigt sind, kann für die Gewinnung solcher Substanzen bedeutungsvoll sein.

Ein weiterer biotechnologisch interessanter Aspekt war die Verkürzung der lag-Phase bis zum Einsetzen der Bio-transformation von Digitoxin zu Digoxin durch immobilisierte Zellen von Digitalis lanata. Durch Einschluß der Zellen in Alginatgel kann die Kulturdauer bis zur Produktakkumulation verkürzt und die Transformationsfähigkeit immobilisierter Zellen in kontinuierlichen Prozessen sehr viel länger genutzt werden, als es bei frei suspendierten Zellen der Fall ist.

Durch Einschluß in Alginatgel waren Zellen von Morinda citrifolia bei vermindertem Wachstum zu 10fach höherer Anthrachinonbildung fähig als frei suspendierte unter den gleichen Bedingungen kultivierte Zellen. Offensichtlich wurde das biochemische Potential der immobilisierten Zellen vom Wachstum entkoppelt und daraufhin verstärkt zur Bildung der Sekundärstoffe eingesetzt. Möglicherweise hat auch der vom Gel auf die Zellen ausgeübte Druck einen Streßzustand hervorgerufen, der die Zellen zur erhöhten Produktbildung anregte. Ob die gesteigerte Fähigkeit zu de novo-Synthese ein genereller Effekt der Immobilisierung ist, kann allein aus den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen noch nicht angenommen werden. Die an immobilisierten Zellen beobachteten positiven Effekte auf den Zellmetabolismus berechtigen aber zur Hoffnung, daß diese Methode zur effektiven Gewinnung von Naturstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen beitragen kann.

Die Untersuchung stoffwechselphysiologischer Prozesse auf dem Niveau der Zelle selbst kann zum Verständnis der biochemischen Leistungen pflanzlicher Zellen und damit auch der einer Zellkultur beitragen. Seitdem es gelungen ist, aus pflanzlichem Gewebe Protoplasten herzustellen und diese zum Isolieren von Vakuolen zu verwenden, standen sehr geeignete Objekte für physiologische Untersuchungen zur Verfügung. Da sowohl bei Protoplasten als auch bei Vakuolen die Außenmembranen (Plasmalemma bzw. Tonoplast) direkt zugänglich sind, eignen sie sich besonders gut, um Transportvorgänge an diesen Membranen zu untersuchen (DOLL et al., 1979; LIN et al., 1977; WILLENBRINK und DOLL, 1979). Protoplasten sind besonders gut zur schonenden Isolierung von Zellorganen geeignet (ZUILY-FODIL et al., 1978) und können auf diese Weise zur Lokalisierung von Enzymen oder Metaboliten und Endprodukten des Zellstoffwechsels beitragen (KANAI und

EDWARDS, 1973; GROB und MATILE, 1979; HRAZDINA et al., 1978). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die an Vakuolen von Armoracia lapathifolia erprobte Methode der Vakuolenisolierung mit Hilfe von Urografin-Dichtegradientenzentrifugation (GROB und MATILE, 1979) erfolgreich auch zur Isolierung und Reinigung von Catharanthus roseus Vakuolen angewendet werden. Diese Methode wurde denen von anderen Autoren beschriebenen (BOLLER und KENDE, 1979; SAUNDERS, 1979; SASSE et al., 1979) vorgezogen, da sie sehr saubere Vakuolenpräparationen mit hohen Ausbeuten in kürzester Zeit ermöglichte. Auf diese Weise standen auch größere Mengen an Vakuolen für Lokalisierungs- und Transportuntersuchungen zur Verfügung.

Vergleichende Untersuchung der Enzymaktivitäten in ganzen Zellen, isolierten Protoplasten und daraus freigesetzten Vakuolen von Catharanthus roseus haben gezeigt, daß sowohl die Strictosidin-Synthase, die spezifische als auch die unspezifische Glucosidase im cytoplasmatischen Raum der Zelle lokalisiert sind. In isolierten Vakuolen waren weder die hier untersuchten Enzyme der Indolalkaloidbiosynthese noch die unspezifische Glucosidase nachgewiesen worden. Das Strictosidin-spezifische Enzym ist für einen wichtigen Schritt innerhalb einer komplexen Biosynthesesequenz verantwortlich und konnte nur in Zellkulturen von Apocynaceae nachgewiesen werden (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980), die zur Synthese von Indolalkaloiden fähig sind. Zellkulturen anderer, nicht-verwandter, Pflanzenfamilien (Caprifoliaceae, Fabaceae, Solanaceae) enthalten dieses Enzym nicht, wohl aber die unspezifische Glucosidase, die in Zellkulturen der Apocynaceae ebenfalls nachgewiesen wurde. Die Vermutung, daß spezifische und unspezifische Glucosidase innerhalb der Zelle räumlich getrennt lokalisiert sind, konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine Kompartimentierung durch Integration von einem dieser Enzyme in die Vakuole der Zelle war nicht gegeben, da in den isolierten Vakuolen weder Aktivität der unspezifischen noch der spezifischen Glucosidase gefunden wurde. Eine eventuell notwendige Trennung der beiden Enzyme innerhalb der Zelle kann daher nur durch Kompartimentierung im cytoplasmatischen Raum gegeben sein.

Isolierte Vakuolen von Catharanthus roseus waren durch hohe Enzymaktivität der sauren Phosphatase charakterisiert. Da die in Protoplasten und den daraus isolierten Vakuolen gemessenen Enzymaktivitäten einander entsprachen, kann angenommen werden, daß die saure Phosphatase in Catharanthus roseus Protoplasten fast ausschließlich in der Vakuole lokalisiert ist. Die saure Phosphatase ist also, wie an Vakuolen von Nicotiana glutinosa bereits beschrieben (METTLER und LEONARD, 1979) als "marker"-Enzym zur Charakterisierung isolierter Vakuolen auch von Catharanthus roseus geeignet.

Durch Isolierung der Vakuolen konnten nicht nur Enzyme der Indolalkaloidbiosynthese sondern auch deren Produkte innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an isolierten Protoplasten von Catharanthus roseus deuteten bereits darauf hin, daß Serpentin in der Vakuole der Zellen deponiert wird (DEUS, 1977). Durch vergleichende Untersuchung der Serpentinegehalte von Zellen, Protoplasten und Vakuolen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der endgültige Beweis erbracht werden, daß Serpentin in den Vakuolen der Zellen lokalisiert ist. Die genaue quantitative Serpentinbestimmung in den Vakuolenextrakten wurde dabei durch Anwendung des Radioimmuntests ermöglicht, der eine spezifische Bestimmung sehr kleiner Substanzmengen erlaubt, so daß theoretisch sogar der Substanzgehalt einer

einzigsten Zelle erfaßt werden kann (WEILER, 1977 b).

Für die Akkumulation der Inhaltsstoffe in der Vakuole der Zellen sind regulatorische Prozesse im Plasma und im Tonoplasten erforderlich. Die Aufnahme- und Speicherkapazität der Vakuolen für einen bestimmten Naturstoff stellt eine natürliche Grenze für die Höhe der Produktbildung einer Zelle dar und ist daher ein wesentlicher Faktor für die Produktionsfähigkeit einer Zellkultur. Dieser Aspekt der Produktbildung einer kultivierten Pflanzenzelle ist bisher kaum untersucht worden.

An isolierten Vakuolen von Beta vulgaris wurde der Saccharoseeintransport untersucht (WILLENBRINK und DOLL, 1979). Es konnte ein sehr spezifisches, energieabhängiges Transportsystem nachgewiesen werden, das seine Energie aus der ATP-Spaltung einer Tonoplasten gebundenen ATPase bezieht und Saccharose gegen einen Gradienten in den Vakuolen akkumuliert. Bei der Alkaloidaufnahme isolierter Vakuolen von Catharanthus roseus (diese Arbeit) handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen ATP-abhängigen, sondern um einen elektrochemischen Prozeß. KCl im Inkubationsmedium steigerte die Vindolinaufnahme isolierter Vakuolen um das 9fache, während ATP deutlich hemmend auf die Alkaloidaufnahme wirkte. Andererseits kann vermutet werden, daß der endogene ATP-Gehalt isolierter Vakuolen für die Aufnahme applizierter Alkaloide ausgereicht hatte. Ein hoher ATP-Gehalt isolierter Vakuolen konnte z.B. in Vakuolen von Beta vulgaris gemessen werden (0.08 nMol pro Betacyanin-Einheit) (DOLL et al., 1979), zusätzlich appliziertes ATP konnte die Saccharoseakkumulation in diesem System aber um weitere 30 % fördern.

Berechnet man die Alkaloidaußen- und -innenkonzentrationen bei Vakuolen von Catharanthus roseus, denen steigende Mengen Vindolin oder Ajmalicin appliziert worden waren,

findet man, daß es sich bei der Vindolinaufnahme bis zum Erreichen eines Sättigungswertes um einen Konzentrationsausgleich des Vindolingehaltes zwischen Inkubationsmedium und Vakuolen handeln muß, Ajmalicin wird dagegen gegen den Konzentrationsgradienten in den isolierten Vakuolen akkumuliert. Eine rein passive Diffusion kann dabei aus zwei Gründen ausgeschlossen werden. Mit zunehmender Alkaloidkonzentration im Medium wird die Anreicherung der Alkaloide in den Vakuolen gesättigt. Dieser Effekt konnte bei Applikation verschiedener Alkaloide (Ajmalicin, Vindolin, Catharanthin) an Vakuolen von Catharanthus roseus aber auch bei der Ajmalin-Aufnahme von Rauwolfia serpentina-Vakuolen und der Nikotin-Aufnahme von Vakuolen aus Nicotiana sylvestris festgestellt werden. Vakuolen von Catharanthus roseus zeigten dabei eine deutliche Präferenz für Ajmalicin, d.h. bei gleicher Konzentration der angebotenen Alkaloide wurde im Sättigungsbereich etwa 5mal soviel Ajmalicin als Vindolin oder Catharanthin aufgenommen. Der zweite Grund, der gegen eine rein passive Alkaloidaufnahme in die Vakuolen spricht, ist die Tatsache, daß aus dem Spektrum der angebotenen Alkaloide selektiv nur diejenigen Substanzen von den isolierten Vakuolen aufgenommen wurden, die ein spezifischer Inhaltsstoff des betreffenden Pflanzengewebes sind. So wurden von den Vakuolen der Indolalkaloid führenden Apocynaceae Rauwolfia serpentina und Catharanthus roseus nur die Indolalkaloide Ajmalicin, Ajmalin, Vindolin und Catharanthin aufgenommen. Das Tropanalkaloid Scopolamin wurde nur von Vakuolen aus Datura- und Duboisia-Arten akkumuliert und eine deutliche Aufnahme von Nikotin konnte nur bei Vakuolen von Nicotiana sylvestris gemessen werden. Daucus carota-Zellen enthalten weder Indol- noch Tropanalkaloide. Ihre Vakuolen waren nicht in der Lage, die applizierten, für sie unspezifischen Alkaloide aufzunehmen. Die Alkaloidaufnahme der Vakuolen ist also kein unkontrollierter Prozeß,

sondern wird offensichtlich durch einen selektiven Transportmechanismus bewirkt. Im Tonoplast muß ein spezielles System existieren, das selektiv die Substanzaufnahme der Vakuole kontrolliert und reguliert und so die Akkumulation von Inhaltsstoffen in der Zelle und damit auch die Produktionsfähigkeit einer Zellkultur limitiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen Eindruck von den Variationsmöglichkeiten, die dem biochemischen Potential kultivierter Pflanzenzellen bei der Produktion von Naturstoffen zu eigen ist. Diese Möglichkeiten gezielt zu nutzen, sei es durch Applikation von Hormonen oder Vorstufen, durch Anwendung neuer Techniken, z.B. der Immobilisierung, oder durch Selektion von Hochleistungsstämmen, könnte dazu beitragen, die Sekundärstoffbildung pflanzlicher Zellkulturen auch im biotechnologischen Maßstab zur Gewinnung wichtiger Naturstoffe zu nutzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Stoffwechselleistungen in Populationen pflanzlicher Zellkulturen zu erfassen. Variante Zellen mit unterschiedlichen biochemischen Fähigkeiten sollten isoliert werden, um u.a. Zellstämme mit erhöhter Naturstoffproduktion zu etablieren. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- I. Die Anwendung sehr empfindlicher Analysenmethoden erlaubt die quantitative Bestimmung von Vorstufen (Loganin/Secologanin) und Endproduktgehalten (Serpentin, Ajmalicin, Tetrahydroalstonin) und die Untersuchung der Enzymaktivität der Strictosidin-Synthase sogar noch in ca. 60 - 80 Zellen umfassenden Sektoren einer einzigen Zellkolonie von Catharanthus roseus. Kolonien, die aus einer Suspensionskultur gewonnen wurden, zeigen extreme Variationen im Gehalt der Vorstufe Loganin/Secologanin (0 % - 4 % pro Trockengewicht), der Akkumulation der Indolalkaloide (0 % - 1 %) und der spezifischen Aktivität der Strictosidin-Synthase (3 - 23 pkat pro mg TG). Die Höhe der Alkaloidbildung ist mit der Menge der zur Verfügung stehenden Vorstufe korreliert und wird durch die Enzymaktivität der Strictosidin-Synthase beeinflusst. Es lassen sich Zellstämme erfassen, die bis zur 5fach gesteigerten Alkaloidbildung gegenüber der Ausgangskultur fähig sind und sich außerdem durch Stabilität ihrer Produktbildung auszeichnen. Darüber hinaus lassen sich gezielt Stämme isolieren, die nur eines der Alkaloide aus der Gesamtheit ihrer Inhaltsstoffe vermehrt produzieren, oder solche, die fast Alkaloid-frei sind.

- II. Es wird eine neue Selektionsmethode zur Isolierung varianter Zellstämme vorgestellt, bei der durch Anregung mit Strahlung geeigneter Wellenlänge ungefärbte Inhaltsstoffe in der lebenden Zelle sichtbar gemacht werden. Daß die dabei im Mikroskop beobachtete Fluoreszenzintensität ein geeignetes Merkmal ist, um gut produzierende Zellen zu erkennen, hat die Korrelation mit radioimmunologischen Analysen von Extrakten selektierter Zellkolonien bewiesen. Durch optische Selektion lassen sich unter sterilen Bedingungen innerhalb kurzer Zeit aus umfangreichen Populationen Zellkolonien von Catharanthus roseus selektieren, die sich zu Zellstämmen mit überdurchschnittlichem Alkaloidgehalt (bis 400 mg/l als Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) entwickeln. Durch Isolierung von Zellkolonien, die sich in der Farbe ihrer Primärfluoreszenz unterscheiden, können aus heterogenen Zellpopulationen, z.B. von Ruta- oder Eschscholtzia-Arten, Zellstämme etabliert werden, die im Muster der gebildeten Inhaltsstoffe deutlich verschieden sind. Prinzipiell kann die Selektion durch Fluoreszenzmikroskopie bei Zellen jeder Pflanzenart eingesetzt werden, sofern sie Inhaltsstoffe produzieren, die bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge fluoreszieren.
- III. Unter identischen Kulturbedingungen zeigen variante Zellstämme von Catharanthus roseus deutliche Unterschiede im Wachstum, in der Höhe der Alkaloidbildung und im zeitlichen Ablauf der Alkaloidsynthesen. Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin werden im Kulturzyklus entweder gleichzeitig oder deutlich zeitlich voneinander getrennt gebildet. Dabei können die Alkaloide in den Zellen akkumulieren oder aber im Laufe der Kultivierung metabolisiert werden. Die Enzyme zur Bildung von Zwischenstufe (Cathenamin) und

Endprodukten der Indolalkaloidbiosynthese sind nur zu bestimmten Zeitpunkten der Kultivierung maximal aktiv. Diese Zeitpunkte sind mit Leitfähigkeitsänderungen im Kulturmedium korreliert.

IV. Verschieden substituierte Phenoxyessigsäuren beeinflussen die Loganin/Secologanin- und Alkaloidgehalte von Catharanthus roseus Suspensionskulturen. Dabei ist ihre Wirkung auf den Gehalt der Vorstufe mit der Höhe der Alkaloidakkumulation korreliert. Phenoxyessigsäuren, die in para-Stellung halogeniert sind, hemmen die Bildung der Vorstufe und damit die Akkumulation der Indolalkaloide um mehr als 80 %. Erhöhte Bildung von Loganin/Secologanin, z.B. nach Applikation methylierter Phenoxyessigsäuren, hat immer gesteigerte Produktbildung zur Folge. Unter dem Einfluß verschiedener Effektoren sind selbst Zellen einer Population zu sehr unterschiedlichen biochemischen Leistungen fähig. Die Potenz zur hohen Produktbildung ist in den Zellen vorhanden, kann aber erst nach Zugabe eines geeigneten Effektors verwirklicht werden.

V. Zellen einer Population von Catharanthus roseus Suspensionskulturen unterscheiden sich deutlich in der Fähigkeit, exogen angebotenes Tryptamin oder Tryptophan zur erhöhten Produktion von Indolalkaloiden zu verwenden. Bei Zellen, die bereits in Vorstufen-freiem Medium zu hoher Alkaloidbildung fähig sind, wird die Sekundärstoffbildung im allgemeinen durch appliziertes Tryptamin oder Tryptophan gehemmt. Andererseits können fluoreszenzmikroskopisch Zellstämme von Catharanthus roseus selektiert werden, deren Alkaloidproduktion nach Applikation von Tryptamin (10fach) und Tryptophan (9fach) wesentlich gegenüber

Zellen auf Vorstufen-freiem Medium erhöht ist. Ein hochproduzierender Zellstamm von Catharanthus roseus ist nach Zugabe von Tryptophan zu der überdurchschnittlichen Bildung von 480 mg/l Alkaloid (Summe von Serpentin, Ajmalicin und Tetrahydroalstonin) befähigt.

VI. Nach Behandlung mit 5-Methyltryptophan können unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie 5-Methyltryptophan-resistente Zellstämme von Catharanthus roseus isoliert werden, die sich durch eine, gegenüber der unbehandelten Ausgangskultur, wesentlich (110fach) erhöhten Alkaloidbildung auszeichnen.

VII. Durch Untersuchung der Chromosomenzahl an Wurzelspitzenzellen differenzierter Catharanthus roseus Pflanzen wurden konstant die charakteristische Chromosomenzahl von $2n = 16$ der diploiden Zelle bestätigt, aber nur 0.5 % aller untersuchten Zellen aus Suspensionskulturen haben sich ebenfalls als noch diploid erwiesen. Im Laufe zweijähriger Kultivierung hat sich das ursprünglich diploide Gewebe durch unregelmäßige Vervielfältigung oder Fragmentation von Chromosomen wesentlich verändert. Es wurden Chromosomenzahlen von 8 bis 81 pro Zelle gefunden. Dabei war die Alkaloidbildung varianter Zellstämme negativ korreliert mit der Anzahl der Chromosomen ihrer Zellen.

VIII. Die Immobilisierung ganzer Zellen in einer festen Matrix wurde zum ersten Mal an kultivierten Zellen höherer Pflanzen durchgeführt. Die Verwendung von Na-Alginat als Matrix ermöglicht einen schonenden Zelleinschluß auch unter aseptischen Bedingungen. Die metabolischen Fähigkeiten immobilisierter Zellen bleiben, auch über einen längeren Zeitraum (ca. 35 Tage)

vollständig erhalten. Die dabei beobachteten positiven Effekte der Immobilisierung auf den Zellmetabolismus, z.B. die 10fache Steigerung der Anthrachinonbildung immobilisierter Morinda citrifolia Zellen gegenüber frei suspendierten Zellen, berechtigen zur Hoffnung, daß diese Methode zur effektiven Gewinnung von Naturstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen beitragen kann.

- IX. Aus Protoplasten von Catharanthus roseus lassen sich Vakuolen isolieren und in größeren Mengen anreichern. Durch radioimmunologische Bestimmung des Serpentinegehaltes isolierter Vakuolen konnte endgültig bestätigt werden, daß Serpentin in der Vakuole der Zellen lokalisiert ist. Vergleichende Untersuchungen der Enzymaktivitäten von Zellen, isolierten Protoplasten und freigesetzten Vakuolen haben die cytoplasmatische Lokalisierung der Strictosidin-Synthase, der spezifischen und unspezifischen Glucosidase in Catharanthus roseus Zellen bewiesen. Saure Phosphatase ist dagegen fast ausschließlich in den Vakuolen lokalisiert. Die Aufnahme applizierter Alkaloide in isolierte Vakuolen wird offensichtlich nicht von einem ATP-abhängigen, sondern von einem elektrochemischen Prozeß bewirkt. Die Alkaloidaufnahme wird durch hohe Substratkonzentrationen gesättigt. Es werden sehr selektiv nur die für die betreffende Pflanzenart spezifischen Alkaloide von isolierten Vakuolen akkumuliert, dabei kann eine dieser Substanzen bevorzugt aufgenommen werden. Die Aufnahme von Alkaloiden in die Vakuole der Zellen wird durch ein spezielles System innerhalb des Tonoplasten kontrolliert und reguliert und so die Akkumulation von Inhaltsstoffen in der Zelle und damit die Produktionsfähigkeit einer Zellkultur limitiert.

VI. LITERATUR

- ABE, S.: Mutants and Their Utilization. In: The Microbial Production of Amino Acids. YAMADA, K., KINOSHITA, S., TSUNODA, T., AIDA, K. (eds.), 39-68. John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto 1972
- ABOU-MANDOUR, A.A., FISCHER, S., CZYGAN, F.-C.: Regeneration von intakten Pflanzen aus diploiden und haploiden Kalluszellen von Catharanthus roseus. Z. Pflanzenphysiol. 91, 83-88 (1979)
- AKASU, M., ITOKAWA, H., FUJITA, M.: Biscoclaurine Alkaloids in Callus Tissue of Stephania cepharantha. Phytochemistry 15, 471-473 (1976)
- ALFERMANN, W., REINHARD, E.: Isolierung anthocyanhaltiger und anthocyanfreier Gewebestämme von Daucus carota: Einfluß von Auxinen auf die Anthocyanbildung. Experientia 27, 353-354 (1971)
- ALFERMANN, W., REINHARD, E.: Possibilities and Problems in Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. In: Production of Natural Products by Cell Culture Methods. ALFERMANN, W., REINHARD, E. (eds.) BPT-Report 1, 3-15 (1978)
- ARENS, H.: Aufstellung und Anwendung eines Radioimmunoassays für Serpen in u i Raubasin. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1976
- AZERAD, R., CHALDERÓN-SEGUIN, R., DECOTTIGNIES-Le-MARÉCHAL, P.: Production de L-Tryptophane par des bactéries immobilisées. Bulletin De La Société Chimique De France 1, 83-86 (1980)
- BAYLISS, M.W.: Origin of Chromosome Number Variation in Cultured Plant Cells. Nature 246, 529-530 (1973)
- BEHKI, R.M., LESLEY, S.M.: Uptake of Exogenous DNA by Carrot Protoplasts. In Vitro 15, 851-856 (1979)
- BELOSERSKI, A.N., PROSKURJAKOW, N.I.: Praktikum der Biochemie der Pflanzen, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1956
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. Anal. Biochem. 70, 241-250 (1976)

- BERGMANN, L.: Growth and Division of Single Cells of Higher Plants in vitro. J.gen.Physiol. 43, 841-851 (1960)
- BERGMEYER, H.-U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962
- BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Recent Studies on Insulin-Binding Antibodies. Ann.N.Y.Acad.Sci. 82, 338-344 (1959)
- BINDING, H.: Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von Petunia hybrida L.. Z. Pflanzenphysiol. 74, 327-356 (1974)
- BLAKELY, L.M., STEWARD, F.C.: Growth and Organized Development of Cultured Cells. VII. Cellular Variation. Amer. J. Bot. 51, 809-820 (1964)
- BODER, G.B., GORMAN, M., JOHNSON, I.S., SIMPSON, P.J.: Tissue Culture Studies of Catharanthus roseus Crown Gall. Lloydia 27, 328-333 (1964)
- BÖHM, H., RINK, E.: Zur Rolle eines Reticulin-umwandelnden Enzyms (Berberin-Brücken-Enzym) im pflanzlichen Benzylisochinin-Stoffwechsel. Biochem.Physiol. Pflanzen 168, 69-77 (1975)
- BOLLER, Th., KENDE, H.: Hydrolytic Enzymes in the Central Vacuole of Plant Cells. Plant Physiol. 63, 1123-1132 (1979)
- BOURGIN, J.-P., CHUPEAU, Y., MISSONIER, C.: Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of several Nicotiana Species. Physiol.Plant 45, 288-292 (1979)
- BRESCH, C., HAUSMANN, R.: Klassische und molekulare Genetik. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970
- BRISKIN, D.P., LEONARD, R.T.: Ion Transport in Isolated Protoplasts from Tobacco Suspension Cells. Plant Physiol. 64, 959-962 (1979)
- BRODELIUS, P., DEUS, B., MOSBACH, K., ZENK, M.H.: Immobilized Plant Cells for the Production and Transformation of Natural Products. FEBS Letters 103, 93-97 (1979)
- BUSER, Ch., MATILE, Ph.: Malic Acid in Vacuoles Isolated from Bryophyllum Leaf Cells. Z. Pflanzenphysiol. 82, 462-466 (1977)

- BUTCHER, H.C., WAGNER, G.J., SIEGELMAN, H.W.: Localization of Acid Hydrolases in Protoplasts. *Plant Physiol.* 59, 1098-1103 (1977)
- CHEETHAM, P.S.J., BLUNT, K.W., BUCKE, C.: Physical Studies on Cell Immobilization using Calcium Alginate Gels. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 2155-2168 (1979)
- CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T.: Production of L-Aspartic Acid by Microbial Cells entrapped in Polyacrylamide Gels. *Methods in Enzymology* 44, 739-746 (1976)
- CONSTABEL, F.: Pigmentbildung in Kalluskulturen aus Beta-Rüben. *Naturwissenschaften* 54, 175-176 (1967)
- COOPER, L.S., COOPER, D.C., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J.: Chromosome Numbers in Single Cell Clones of Tobacco Tissue. *Amer. J. Bot.* 51, 284-290 (1964)
- CORDUAN, G., REINHARD, E.: Synthesis of Volatile Oils in Tissue Cultures of Ruta graveolens. *Phytochemistry* 11, 917-922 (1972)
- CROCKER, B.H.: Effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid on Mitosis in Allium cepa. *Bot.Gaz.* 114, 274-283 (1953)
- CZYGAN, F.-C.: Möglichkeiten zur Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche Gewebekulturen. *Planta medica Suppl.*, 169-185 (1975)
- DARLINGTON, C.D., LA COUR, L.F.: Methoden der Chromosomenuntersuchungen, Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1963
- DEUS, B.: Selektion von Zellstämmen von Catharanthus roseus mit erhöhter Alkaloidproduktion, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1977
- DEUS, B.: Zellkulturen von Catharanthus roseus. In: Production of Natural Products by Cell Culture Methods. ALFERMANN, W., REINHARD, E. (eds.) BPT-Report 1, 118-129 (1978)
- DHRUVA, B., RAMAKRISHNAN, T., VAIDYANATHAN, C.S.: Studies in Catharanthus roseus Callus Cultures, Callus Initiation and Differentiation. *Curr. Sci.* 46, 364-365 (1977)
- DÖLLER, G., ALFERMANN, W., REINHARD, E.: Produktion von Indolalkaloiden in Calluskulturen von Catharanthus roseus. *Planta medica* 30, 14-20 (1976)

- DOLL, S., RODIER, F., WILLENBRINK, J.: Accumulation of Sucrose in Vacuoles Isolated from Red Beet Tissue. Planta 144, 407-411 (1979)
- DURAND, J., POTRYKUS, I., DONN, G.: Plantes issues de Protoplastes de Petunia. Z. Pflanzenphysiol. 69, 26-34 (1973)
- ESAU, K., CHARVAT, I.D.: An Ultrastructural Study of Acid Phosphatase Localization in Cells of Phaseolus vulgaris Phloem by the Use of the Azo Dye Method. Tissue & Cell 7, 619-630 (1975)
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res. 50, 151-158 (1968)
- GAUTHERET, R.J.: Sur la possibilité de réaliser la Culture indéfinie des Tissus de Tubercules de Carotte. C.R. hébd. Séances Acad. Sci. 208, 118-120 (1939)
- GERTIG, H.: Alkaloids of Eschscholtzia californica CHAM. I. Separation of Alkaloidal Fractions from Roots by Thin-Layer Chromatography. Acta Poloniae Pharmaceutica 21, 62-68 (1964a)
- GERTIG, H.: Alkaloids of Eschscholtzia californica CHAM. II. Separation and Thin-Layer Chromatography of the Alkaloidal Fractions Obtained from the Aerial Parts of the Plant. Acta Poloniae Pharmaceutica 21, 135-139 (1964b)
- GLEBA, Y.Y.: Extranuclear Inheritance Investigated by Somatic Hybridization. In: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. THORPE, T.A. (ed.) Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, Canada, 1978
- GLEBA, Y.Y., KOHLENBACH, H.W., HOFFMANN, F.: Root Morphogenesis in Somatic Hybrid Cell Lines Arabidopsis thaliana + Brassica campestris. Naturwissenschaften 65, 655-657 (1978)
- GROB, K., MATILE, Ph.: Vacuolar Location of Glucosinolates in Horseradish Root Cells. Plant Science Letters 14, 327-335 (1979)
- GRUN, P., CHU, L.-J.: Development of Plants from Protoplasts of Solanum (Solanaceae). Amer. J. Bot. 65, 538-543 (1978)

- HABERLANDT, G.: Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math. Nat. Classe 111, Abt. 1, 69-92 (1902)
- HAHLBROCK, K., EBEL, J., ORTMANN, R., SUTTER, A., WELLMANN, E., GRISEBACH, H.: Regulation of Enzyme Activities Related to the Biosynthesis of Flavone Glucosides in Cell Suspension Cultures of Parsley (Petroselinum hortense). Biochem. Biophys. Acta 244, 7-15 (1971a)
- HAHLBROCK, K., KUHLEN, E., LINDL, T.: Änderungen von Enzymaktivitäten während des Wachstums von Zellsuspensionskulturen von Glycine max: Phenylalanin-ammoniumlyase und p-Cumarat CoA Ligase. Planta 99, 311-318 (1971b)
- HAHLBROCK, K., EBEL, A., OAKS, A., AUDEN, J., LIERSCH, M.: Determination of Specific Growth Stages of Plant Cell Suspension Cultures by Monitoring Conductivity Changes in the Medium. Planta 118, 75-84 (1974)
- HAHLBROCK, K., GRIESEBACH, H.: Enzymic Controls in the Biosynthesis of Lignin and Flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 105-130 (1979)
- HELDT, H.W., SAUER, F.: The Inner Membrane of the Chloroplast Envelope as the Site of Specific Metabolite Transport. Biochem. Biophys. Acta 234, 83-91 (1971)
- HEMSCHIEDT, Th.: Nachweis, Anreicherung und Charakterisierung spezifischer Strictosidin- β -Glucosidasen aus Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1979
- HEMSCHIEDT, Th., ZENK, M.H.: Glucosidases involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of Catharanthus Cell Cultures. FEBS Letters 110, 187-191 (1980)
- HESSE, H., BERNHARD, H.O.: Alkaloide 3, Verlag Chemie, Weinheim 1975
- HIRAOKA, N., TABATA, M.: Alkaloid Production by Plants Regenerated from Cultured Cells of Datura innoxia. Phytochemistry 13, 1671-1675 (1974)
- HRAZDINA, G., WAGNER, G.J., SIEGELMAN, H.W.: Subcellular Localization of Enzymes of Anthocyanin Biosynthesis in Protoplasts. Phytochemistry 17, 53-56 (1978)
- KANAI, R., EDWARDS, G.E.: Separation of Mesophyll Protoplasts and Bundle Sheath Cells from Maize Leaves for Photosynthesis Studies. Plant Physiol. 51, 1133-1137 (1973)

- KAUL, B., STOHS, S.J., STABA, E.J.: Dioscorea Tissue Cultures. III. Influence of various Factors on Diosgenin Production by Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Cultures. Lloydia 32, 347-359 (1969)
- KOBLITZ, H.: Isolierung und Kultivierung von Protoplasten aus Calluskulturen von Catharanthus roseus. Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 489-499 (1975)
- KOBLITZ, H., SCHUMANN, U., BÖHM, H., FRANKE, J.: Gewebekulturen aus Alkaloidpflanzen IV. Macleaya microcarpa (Maxim) Fedde. Experientia 31, 768 - 769 (1975)
- KOMOR, E.: Sucrose Uptake by Cotyledones of Ricinus communis L.: Characteristics, Mechanism and Regulation. Planta 137, 119-131 (1977)
- LEISTNER, E.: Isolierung, Identifizierung und Biosynthese von Anthrachinonen in Zellsuspensionskulturen von Morinda citrifolia. Planta medica Suppl., 216-224 (1975)
- LIN, W., WAGNER, G.J., SIEGELMAN, H.W., HIND, G.: Membranebound ATPase of Intact Vacuoles and Tonoplasts Isolated from Mature Plant Tissue. Biochim. Biophys. Acta 465, 110-117 (1977)
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 18, 100-127 (1965)
- LÖRZ, H., POTRYKUS, I.: Investigation on the Transfer of Isolated Nuclei into Plant Protoplasts. Theor. Appl. Genet. 53, 251-256 (1978)
- MANSKE, R.H.F., SHIN, K.H.: The Alkaloids of Papaveraceous Plants. LIII. Eschscholtzia californica CHAM. Canadian J. Chemistry 43, 2180-2182 (1965)
- MÁRTON, L., WULLEMS, G.J., MOLENDIJK, L., SCHILPEROORT, R.A.: In vitro Transformation of Cultured Cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Nature 227, 129-131 (1979)
- MELCHERS, G., BERGMANN, L.: Untersuchungen an Kulturen von haploiden Geweben von Antirrhinum majus. Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. 71, 459-473 (1958)
- MENCZEL, L., LÁZÁR, G., MALIGA, P.: Isolation of Somatic Hybrids by Cloning Nicotiana Heterokaryons in Nurse Cultures. Planta 143, 29-32 (1978)

- METTLER, I.J., LEONARD, R.T.: Isolation and Partial Characterization of Vacuoles from Tobacco Protoplasts. *Plant Physiol.* 64, 1114-1120 (1979)
- MISHRA, A.K., ARORA, D.K.: Physiological Evidence for quick Regeneration of Wall on Isolated Plant Protoplasts. *Curr. Sci.* 47, 820-822 (1978)
- MITRA, J., STEWARD, F.C.: Growth Induction in Cultures of Haplopappus gracilis. II. The Behaviour of the Nucleus. *Amer. J. Bot.* 48, 358-368 (1961)
- MOSBACH, K.: Introduction in: *Methods in Enzymology* 44, 3-7 (1976)
- MUIR, W.H., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J.: Plant Tissue Cultures produced from Single Isolated Cells. *Science* 119, 877-878 (1954)
- MURPHY, T.H., HAMILTON, C.M.: A Strain of Rosa damascena Cultured Cells Resistant to Ultraviolet Light. *Plant Physiol.* 64, 936-941 (1979)
- NAGAKURA, N., RÜFFER, M., ZENK, M.H.: The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine. *J.Chem.Soc.* 2308-2312 (1979)
- NITSCH, J.P., NITSCH, C.: Haploid Plants from Pollen Grains. *Science* 163, 85-87 (1969)
- NOBÉCOURT, P.: Cultures en Série de Tissus végétaux sur Milieu artificiel. *C.R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci.* 205, 521-523 (1937)
- NOBÉCOURT, P.: Sur les Proliférations spontanées de Fragments de Tubercules de Carotte et leur Culture sur Milieu synthétique. *Bull. Soc. Bot. France* 85, 1-7 (1938)
- NULTSCH, W.: *Allgemeine Botanik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971
- PALMER, J.E., WIDHOLM, J.: Characterization of Carrot and Tobacco Cell Cultures resistant to p-Fluorophenylalanine. *Plant Physiol.* 56, 233-238 (1975)
- PILWAT, G., WASHAUSEN, P., KLEIN, J., ZIMMERMANN, U.: Immobilization of Human Red Blood Cells. *Z. Naturforsch.* 35, 352-356 (1980)
- POTRYKUS, I., HARMS, C.T., LÖRZ, H.: Callus Formation from Cell Culture Protoplasts of Corn (Zea mays L.). *Theor. Appl. Genet.* 54, 209-214 (1979)
- RAO, K.K., PATEL, V.P.: Effect of Tryptophan and related Compounds on Alkaloid Formation in Aspergillus fumigatus. *Lloydia* 37, 608-610 (1974)

- REHM, H.-J.: Einführungen in die industrielle Mikrobiologie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1971
- REINHARD, E., CORDUAN, G., VOLK, O.H.: Über Gewebekulturen von Ruta graveolens. Planta medica 16, 8-16 (1968)
- REINHARD, E., BOY, M., KAISER, F.: Umwandlung von Digitalis Glucosiden durch Zellsuspensionskulturen. Planta medica Suppl., 163-168 (1975)
- RICHTER, I., STOLLE, K., GRÖGER, D., MOTHES, K.: Über Alkaloidbildung in Gewebekulturen von Catharanthus roseus G. Donn. Naturwissenschaften 52, 305-306 (1965)
- RINGE, F.: Förderung der Zellproliferation unter der Einwirkung von 2-Chloräthylenphosphorsäure bei Explantaten von Begonia x richmondensis in steriler Kultur. Z. Pflanzenphysiol. 76, 462-466 (1972)
- RINK, E., BÖHM, H.: Conversion of Reticuline into Scoulerine by a cell free Preparation from Macleaya microcarpa Cell Suspension Cultures. FEBS Letters 49, 396-399 (1975)
- ROSEN, B.P.: Basic Amino Acid Transport in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 246, 3653-3662 (1971)
- RUTHMANN, A.: Methoden der Zellforschung. Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1966
- SASSE, F., BACKS-HÜSEMANN, D., BARZ, W.: Isolation and Characterization of Vacuoles from Cell Suspension Cultures of Daucus carota. Z. Naturforschung 34, 848-853 (1979)
- SAUNDERS, J.A., CONN, E.E.: Presence of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Isolated Vacuoles from Sorghum. Plant. Physiol. 61, 154-157 (1978)
- SAUNDERS, J.A.: Investigations of Vacuoles Isolated from Tobacco. 1. Quantitation of Nicotine. Plant Physiol. 64, 74-78 (1979)
- SCHALLENBERG, J., BERLIN, J.: 5-Methyltryptophane Resistant Cells of Catharanthus roseus. Z. Naturforschung 34, 541-545 (1979)
- SCHIEDER, O.: Regeneration von haploiden und diploiden Datura innoxia Mill. Mesophyll-Protoplasten zu Pflanzen. Z. Pflanzenphysiol. 76, 462-466 (1975)

- SCHIEDER, O.: Isolation of Mutants with altered Pigments after Irradiating Haploid Protoplasts from Datura innoxia Mill. with X-Rays. Molec. gen. Genet. 149, 251-254 (1976)
- SCHNABL, H., BORNMANN, C.H., ZIEGLER, H.: Studies on Isolated Starch-containing (Vicia faba) and Starch-deficient (Allium cepa) Guard Cell Protoplasts. Planta 143, 33-39 (1978)
- SCHULTE, U.: Wachstum und Anthrachinonbildung in Morinda Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1978
- SCHWANN, Th.: Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen. HÜNSELER, R. (ed.), Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig 1910
- SCOTT, A.I., LEE, S.-L.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids. A cell-free System from Catharanthus roseus. J. Am. Chem. Soc. 97, 6906-6908 (1975)
- SCOTT, A.I., LEE, S.-L., WAN, W.: Indole Alkaloid Biosynthesis: Partial Purification of "Ajmalicin Synthetase" from Catharanthus roseus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 75, 1004-1009 (1977)
- SEMPER, U.: Untersuchungen zur Bildung der Strictosidin-Synthase in Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1979
- SINGH, B.D., HARVEY, B.L.: Effects of Different 2,4-D Concentrations on the Cytogenetic Behaviour of Plant Cells Cultured in vitro. Biologia Plantarum 17, 167-174 (1975a)
- SINGH, B.D., HARVEY, B.L.: Selections for diploid Cells in Suspension Cultures of Haplopappus gracilis. Nature 253, 453 (1975b)
- SLAVIK, J., DOLEJS, L.: Alkaloids of the Papaveraceae. LII. The Constitution of Escholine and the Identity of Esholine with Magnoflorine. Coll. Czech. Chem. Comm. 38, 3514-3520 (1973)
- SLAVIK, J., SLAVIKOVA, L.: Alkaloids from Corydalis cava (L.) SCHW. et KOERTE. Coll. Czech. Chem. Comm. 44, 2261-2274 (1979)

- SLAVIKOVA, L., SLAVIK, J.: Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae) XXXIII. Über die Alkaloide von drei Arten der Gattung Eschscholtzia und über die Konstitution des neuen Alkaloids Escholamin. Coll. Czech. Chem. Comm. 31, 3362-3372 (1966)
- SRERE, P.A., UYEDA, K.: Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices. Methods in Enzymology 44, 11-19 (1976)
- STÄRK, D., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E.: Verlauf von Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität, Anthocyan- und Chlorogensäurebildung in verschiedenen Zellstämmen von Daucus carota. Planta medica 30, 104-117 (1976)
- STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
- STEARNS, W.T.: A Synopsis of the Genus Catharanthus (Apocynaceae). In: The Catharanthus Alkaloids. TAYLOR, W.I., FARNSWORTH, N.R. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York 1975
- STECK, W., CONSTABEL, F.: Biotransformations in Plant Cell Cultures. Lloydia 37, 185-191 (1974)
- STEINEGGER, E., HÄNSEL, R.: Lehrbuch der Pharmakognosie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1972
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K.: Growth and Organized Development of Cultured Cells II. Organisation in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. Am. J. Bot. 45, 705-708 (1958)
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Enzymatic Synthesis of Chlorogenic Acid from Caffeoyl Coenzyme A and Quinic Acid. FEBS Letters 42, 131-134 (1974)
- STÖCKIGT, J., TREIMER, J., ZENK, M.H.: Synthesis of Ajmalicine and related Indole Alkaloids by cell free Extracts of Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. FEBS Letters 70, 267-270 (1976)
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Strictosidine (Isovincoside): the Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpene Indole Alkaloids. J.C.S. Chem. Comm. 646-648 (1977)

- STÖCKIGT, J., HUSSON, H.P., KAN-FAN, C., ZENK, M.H.: Cathenamin, a Central Intermediate in the cell free Biosynthesis of Ajmalicine and related Indole Alkaloids. J.C.S. Chem. Comm. 164-166 (1977)
- STÖCKIGT, J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine. *Phytochemistry* 18, 965-971 (1979)
- SVOBODA, G.H.: Introduction In: The Catharanthus Alkaloids. TAYLOR, W.I., FARNSWORTH, N.R. (eds.); Marcel Dekker Inc., New York 1975
- SVOBODA, G.H., BLAKE, D.A.: The Phytochemistry and Pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. In: The Catharanthus Alkaloids. TAYLOR, W.I., FARNSWORTH, N.R. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York 1975
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., MARUMOTO, Y., KONOSHIMA, M.: Regulation of Nicotine Production in Tobacco Tissue Culture by Plant Growth Regulators. *Phytochemistry* 10, 723-729 (1971)
- TABATA, M., HIRAOKA, N., IKENOUE, M., SANO, Y., KONOSHIMA, M.: The Production of Anthraquinones in Callus Cultures of *Cassia tora*. *Lloydia* 38, 131-134 (1975)
- TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: The Production and Regulation of Shikonin Derivatives in cultured Cells. Abst. 12th. Phytochem.Symp.Japan, Kyoto, 1-8 (1976)
- TABATA, M., HIRAOKA, N.: Variation of Alkaloid Production in *Nicotiana rustica* Callus Cultures. *Physiol. Plant.* 38, 19-23 (1976)
- TAKATA, I., TOSA, T., CHIBATA, I.: Screening of Matrix suitable for Immobilization of Microbial Cells. J. Solid-Phase Biochem. 2, 225-236 (1977)
- TAKEBE, I., LABIB, G., MELCHERS, G.: Regeneration of Whole Plants from Isolated Mesophyll Protoplasts of Tobacco. *Die Naturwissenschaften* 58, 318-320 (1971)
- TANAKA, M., UCHIDA, T.: Heterogeneity of Hydroxyproline-containing Glycoproteins in Protoplasts from a *Vinca rosea* Suspension Culture. *Plant & Cell Physiol.* 20, 1295-1306 (1979)

- TEUSCHER, E.: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. Pharmazie 28, 6-17 (1973)
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Enzymic Synthesis of Corynanthe-Type Alkaloids in Cell Cultures of Catharanthus roseus: Quantitation by Radioimmunoassay. Phytochemistry 77, 227-231 (1978)
- TREIMER, J.F.: Die Strictosidin-Synthase aus pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1979
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Strictosidine Synthase from Cell Cultures of Apocynaceae Plants. FEBS Letters 97, 159-162 (1979a)
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Purification and Properties of Strictosidine Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. Eur. J. Biochem. 101, 225-233 (1979b)
- VELIKY, I.A., BARBER, K.M.: Biotransformation of Tryptophane by Phaseolus vulgaris Suspension Culture. Lloydia 38, 125-130 (1975)
- WALDI, D.: Probleme des Arzneibuches: Eine neue systematische Analyse von Alkaloiden mit Hilfe der Papierchromatographie. Arch. Pharm. 292, 206-220 (1959)
- WEILER, E.W.: Die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin und verwandten Verbindungen in Digitalis lanata EHRH. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1977a
- WEILER, E.W.: Radioimmuno-Screening Methods for Secondary Plant Products. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. BARZ, W., REINHARD, E., ZENK, M.H. (eds.), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1977b
- WENZEL, G., SCHIEDER, O., PRZEWOZNY, T., SOPORY, S.K., MELCHERS, G.: Comparison of Single Cell Culture Derived Solanum tuberosum L. Plants and a Model for their Application in Breeding Programs. Theor. Appl. Génét. 55, 49-55 (1979)
- WIDHOLM, J.M.: Selection and Characterization of Biochemical Mutants. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. BARZ, W., REINHARD, E., ZENK, M.H. (eds.), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1977

- WILLENBRINK, J., DOLL, S.: Characteristics of the Sucrose Uptake of Vacuoles Isolated from Red Beet Tissue. Kinetics and Specificity of the Sucrose Uptake System. *Planta* 147, 159-162 (1972)
- YAMADA, K., KINOSHITA, S., TSUNODA, T., AIDA, K.: The Microbial Production of Amino Acids. John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto 1972
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta medica Suppl.* 79-101 (1975)
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. BARZ, W., REINHARD, E., ZENK, M.H. (eds.), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1977
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ULBRICH, B.: Production of Rosmarinic Acid by Cell-Suspension Cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* 64, 585 (1977)
- ZENK, M.H.: The Impact of Plant Cell Culture on Industry. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* 1978. THORPE, T.A. (ed.) Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, Canada, 1978a
- ZENK, M.H.: "General discussion" In: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. ALFERMANN, A.W., REINHARD, E. (eds.) BPT-Report 1, 183-200 (1978b)
- ZUILY-FODIL, Y., PASSAQUET, C., ESNAULT, R.: High Yield Isolation of Nuclei from Plant Protoplasts. *Physiol. Plant.* 43, 201-204 (1978)

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit überließ, danke ich sehr herzlich für seine freundliche Unterstützung durch Diskussionen und die dadurch vermittelten Anregungen.

Ferner geht mein Dank an Herrn Priv. Doz. Dr. M. Hauser für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Photographien.

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie, Bonn, sei für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit gedankt. Empfänger der Finanzmittel war Prof. Dr. M. H. Zenk.

L e b e n s l a u f

Am 2. Dezember 1953 wurde ich, Brigitte Deus, als Tochter des kaufmännischen Angestellten Georg Deus und seiner Ehefrau Edeltraut, geb. Ackermann, in Essen geboren.

In den Jahren 1960 bis 1964 besuchte ich die Evangelische Volksschule Essen-Margarethenhöhe und trat anschließend in die Luisenschule Essen (Städt. neusp. u. math. naturw. Mädchengymnasium und Gymnasium für Frauenbildung) ein. Seit 1966 besuchte ich das Gymnasium für Frauenbildung der Luisenschule Essen und legte dort im Mai 1972 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1972 nahm ich das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum auf. Im Oktober 1977 legte ich die Diplom-Hauptprüfung ab und begann im November 1977 unter Anleitung von Prof. Dr. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Von November 1977 bis September 1979 war ich als Wissenschaftliche Hilfskraft und seit Oktober 1979 als Wissenschaftliche Assistentin (m.d.V.b.) am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität tätig.



D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 / 8791